

Aus der Klinik für Neurochirurgie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Christopher Nimsky
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



**Qualitativer Nachweis von *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* sowie die
Analyse morphologischer und proliferativer Veränderungen nach
Verringerung der Expression von *CCM1* in HUV Endothelzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Bodil Hansen aus Schleswig

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. med M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. med. U. Sure
1. Korreferent:	Prof. Dr. med. A. Pagenstecher

1. Einleitung	4
1.1. Kavernom	4
1.1.1. Prävalenz	4
1.1.2. Histologie	5
1.1.3. Genetik	5
1.1.4. Klinik	6
1.1.5. Diagnostik	7
1.1.6. Klinisches Management und Therapie	7
1.1.7. Prognose	8
1.2. Molekulargenetik des Kavernom	8
1.2.1. Two-hit Mechanismus	8
1.2.2. <i>CCM1</i> / KRIT1	9
1.2.3. <i>CCM2</i> / Malcavernin	11
1.2.4. <i>CCM3</i> / PDCD10	12
1.3. CCM Moleküle in ihren Signalwegen	14
1.3.1. KRIT1 und Malcavernin im β Integrin Signalweg	14
1.3.2. Aktivierung von p38MAPK	17
1.3.3. Aktivierung des ERK Signalweges	18
1.3.4. KRIT1 und RAP1A	19
1.4. Fragestellung	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Allgemeine Geräte und Materialien	22
2.2. Allgemeines Material in der Zellkultur	22
2.3. Allgemeine Methoden in der Zellkultur	24
2.3.1. Einfrieren von Zellen	25
2.3.2. Auftauen von Zellen	25
2.3.3. Passagieren von Zellen	26
2.3.4. Bestimmung der Zellzahl	26
2.4. Transiente Transfektion mittels GeneSilencer™ siRNA Transfection Reagent	27
2.4.1. short interfering RNA	27
2.5. Echtzeit RT-PCR	28
2.5.1. Ernte des Zellpellets	28

2.5.2.	RNA Isolation	28
2.5.3.	Reverse Transkription	29
2.5.4.	Primer	29
2.5.5.	Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerase- Kettenreaktion	30
2.6.	Morphologie	33
2.7.	Proliferationsassay	34
3.	<i>Ergebnisse</i>	35
3.1.	Expression der CCM Gene in HUV Endothelzellen	35
3.1.1.	CCM1	35
3.1.2.	CCM2	37
3.1.3.	CCM3	39
3.2.	Transfektion k.d. CCM1	40
3.2.1.	Validierung durch Echtzeit RT-PCR	41
3.2.2.	Morphologische Veränderungen	43
3.2.3.	Veränderung des Proliferationsverhaltens	47
4.	<i>Diskussion</i>	49
4.1.	Diskussion von Material und Methoden	49
4.1.1.	RNA interference	49
4.1.2.	Echtzeit RT-PCR	51
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	52
4.2.1.	Expression der <i>CCM</i> Gene in HUV Endothelzellen	52
4.2.2.	Bedeutung der Expression von <i>CCM1</i> , <i>CCM2</i> und <i>CCM3</i> in Endothelzellen	54
4.2.3.	Verminderung der Expression von <i>CCM1</i>	54
4.2.4.	Morphologie	55
4.2.5.	Proliferation	57
5.	<i>Zusammenfassung</i>	61
6.	<i>Abstract</i>	63
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>	65
8.	<i>Anhang</i>	75
8.1.	Abkürzungen	75
8.2.	Lebenslauf	78

Inhaltsverzeichnis

8.2.1. Persönliche Daten	78
8.2.2. Schulbildung	78
8.2.3. Hochschulbildung	78
8.2.4. Promotion	79
8.2.5. Beruflicher Werdegang	79
8.3. Akademische Lehrer	80
8.4. Danksagung	81
8.5. Ehrenwörtliche Erklärung	82

1. Einleitung

Diese Arbeit stellt den Beginn eines Projektes dar, welches zu einem besseren Verständnis der Entstehung des Kavernoms beitragen soll. Die Etablierung der Methoden, zum einen die Etablierung der transienten Transfektion, zum anderen die Etablierung der Echtzeit RT-PCR (Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion), steht im Vordergrund dieser Arbeit.

Die Einleitung, insbesondere die Genetik und die Einbindung der drei *CCM* (Cerebral Cavernous Malformation) Gene in ihre Signalwege, geben einen Einblick in die bisher bekannten Hintergründe des Kavernoms, welche durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt werden.

1.1. Kavernom

Kavernome sind vaskuläre Neubildungen im zentralen Nervensystem, welche aus dilatierten, dünnwandigen, sinusoidalen Blutgefäßen bestehen. Diese Gefäße sind von Bindegewebe umgeben und vom umliegenden neuronalen Parenchym klar abgrenzbar. Kavernome prägen sich klinisch in zerebralen Blutungen, in Krampfleiden oder in fokalen neurologischen Defiziten aus.

1.1.1. Prävalenz

Basierend auf Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) und Autopsie Studien, beträgt die Prävalenz des Kavernoms 0,5% (Robinson et al., 1991; Otten et al., 1989). Da aber nur 20-30% der Betroffenen klinische Symptome aufweisen, liegt die klinische Prävalenz darunter (Robinson et al., 1991).

1.1.2. Histologie

Neben der häufigsten Lokalisation des Kavernoms im Gehirn, kann dieses auch im Rückenmark, der Retina und in Form einer hyperkeratotisch kutan venösen Kapillarmalformation vorkommen (Labauge et al., 1999; Eerola et al., 2000).

Das Kavernom ist charakterisiert durch die eng zusammen liegenden Sinusoide, welche ultrastrukturell von Endothel ausgekleidet und in dichter kollagener Matrix eingebettet sind. Komponenten der Blut-Hirn-Schranke wie die Tight Junctions fehlen gänzlich oder sind nur anormal vorhanden (Wong et al., 2000; Clatterbuck et al., 2001; Tu et al., 2005). Auch die astrozytischen Fortsätze können fehlen, ist der Interzellularspalt der Zellen vergrößert (Wong et al., 2000; Clatterbuck et al., 2001). Histologische Analysen von Kavernomgewebe nach chirurgischer Resektion oder Autopsie zeigen oft extensive Hämosiderin-Ablagerungen, welche durch chronische Blutungen entstanden sind (Zabramski et al., 1999). Die geringe oder fehlende Ausbildung der Tight Junctions liefert eine mögliche Erklärung der chronischen Blutungen. Die Größe der Kavernome variiert von einer Größe weniger Millimeter bis hin zu einer Größe von einigen Zentimetern (Moriarty et al., 1999).

1.1.3. Genetik

Das Auftreten des Kavernoms kann durch sporadische Mutationen oder autosomal dominante Vererbung bedingt sein. Die Expression des Kavernoms ist variabel, die Penetration inkomplett (Labauge et al., 1998; Siegel et al., 1998).

Sporadische Fälle des Kavernoms sind in der Regel charakterisiert durch das Vorkommen einer einzigen Läsion, während familiäre Fälle in der Regel multiple Läsionen aufweisen. Die Anzahl der Läsionen korreliert mit dem Alter der Betroffenen (Labauge et al., 1998; Rigamonti et al., 1988). Die in der Vergangenheit aufgeführte Zahl von 31% der familiären Fälle des Kavernoms, welche nur eine Läsion aufweisen, ist vermutlich deutlich zu hoch angesetzt und begründet sich in der relativen Insensitivität der radiologisch angewendeten Technik (Siegel et al., 1998).

Die familiären Formen des Kavernoms stehen im Zusammenhang mit drei chromosomalen Loci und deren Mutationen. Diese resultieren in einem Funktionsverlust

dieser Gene. Die Loci befinden sich auf dem Chromosom 7q (*KRITI/CCM1*), Chromosom 7p (*MGC4607/CCM2*) und Chromosom 3q (*PDCD10/CCM3*) (Dubovsky et al., 1995; Craig et al., 1998). Die klinischen Symptome der Mutationen in den drei Genen sind ähnlich, die Penetranz hingegen unterscheidet sich. Für *CCM1* beträgt diese, je nach Quelle 60% bzw. 88%, für *CCM2* 100% und für *CCM3* nur 63% (Denier et al., 2004b; Craig et al., 1998).

Nahezu das gesamte Vorkommen familiärer Fälle des Kavernoms in der Population mexikanisch stämmiger US Amerikaner, gründet sich auf Mutationen in *CCM1*, während in anderen Populationen Mutationen in diesem nur für etwa 40-50% der familiären Fälle verantwortlich sind (Gunel et al., 1996). Mutationen in *CCM2* sind für etwa 10-20% und in *CCM3* für etwa 40% der familiären Fälle des Kavernoms verantwortlich (Craig et al., 1998; Verlaan et al., 2004). In allen *CCM* Genen wurde auch von de novo Mutationen berichtet (Denier et al., 2006; Bergametti et al., 2005).

1.1.4. Klinik

Die häufigsten Symptome der am zerebralen Kavernom erkrankten Personen bestehen in Kopfschmerzen, fokalen oder generalisierten Krampfleiden, fokale neurologischen Defiziten und zerebralen Blutungen. Diese Symptome treten in der Regel zwischen der dritten und fünften Lebensdekade auf. Das Kavernom manifestiert sich zu 45% in einem Krampfanfall und zu 41% in einer zerebralen Blutung (Labauge et al., 2007).

In familiären Fällen des Kavernoms treten pro Patientenjahr 0,2-0,4 neue Läsionen auf, ihre prospektive Blutungsrate beträgt 3,1%, und das Neuauftreten eines Krampfleidens beträgt 2,4% pro Patientenjahr (Moriarty et al., 1999).

Eine spinale Lokalisation des Kavernoms ist selten, es kann extra- oder intramedullär, extra- oder intradural liegen. Diese Patienten fallen durch eine akute oder progressive neurologische Symptomatik und Blutungen im Verlauf auf (Zevgaridis et al., 1999; Balaban et al., 2001; Jallo et al., 2006; Ogilvy et al., 1992).

Retinale Kavernome und hyperkeratotische kutane venöse Kapillarmalformationen sind in der Regel asymptomatisch (Gass, 1971; Dobyns et al., 1987; Labauge et al., 1999; Couteulx et al., 2002).

1.1.5. Diagnostik

Der Goldstandard der Diagnostik des Kavernoms, aufgrund der im Vergleich zu anderen Methoden hohen Sensitivität, ist die Magnet Resonanz Tomographie. Im internen Vergleich ist die Bildgebung durch Gradienten-Echo-Sequenzen deutlich sensitiver als die Bildgebung durch Turbo-Spin-Echo-Sequenzen. Etwa 20% der Patienten mit familiär vererbtem Kavernom weisen in den Turbo-Spin-Echo-Sequenzen des MRT in der T1 und T2 Wichtungen nur eine Läsion auf. Aus dieser Subgruppe weisen allerdings 75% in Gradienten-Echo-Sequenzen multiple Läsionen auf (Denier et al., 2006).

Insgesamt detektieren die Gradienten-Echo-Sequenzen des MRT im Vergleich zu Turbo-Spin-Sequenzen die dreifache Anzahl der Läsionen in Patienten, bei denen eine familiäre Vererbung vorliegt (Labauge et al., 1998).

Die Läsionen, dargestellt in Turbo-Spin-Echo-Sequenzen, werden in vier Typen eingeteilt. Typ 1 Läsionen zeigen sich als hyperintense Signale in der T1- und der T2-Wichtung. Dieses Signal spiegelt eine akute Blutung wieder. Typ 2 Läsionen erscheinen als gemischt hyperintense und hypointense Signale, sie sind die typischsten Läsionen des Kavernoms und stellen akute und chronische Blutungen oder Kalzifikationen dar. Typ 3 Läsionen sind hypointense Signale in der T1- und der T2- Wichtung. Hypointense Signale, die nur in der Gradient-Echo Sequenz detektiert werden, sind Typ 4 Läsionen. Typ 3 und Typ 4 Läsionen sind asymptomatisch. Typ 4 Läsionen scheinen den Beginn des Kavernoms darzustellen (Zabramski et al., 1994).

1.1.6. Klinisches Management und Therapie

Die Beobachtung von asymptomatischen Patienten wird mit Hilfe der MRT im Abstand von einem bis zwei Jahren durchgeführt. Bei Progress sollte eine chirurgische Resektion diskutiert werden. Symptomatische Patienten mit einer Blutung werden, wenn möglich, chirurgisch therapiert. Patienten mit epileptischen Anfällen und Ansprechen auf antiepileptische Medikation werden medikamentös eingestellt und weiter beobachtet. Bei Patienten, die nicht oder nicht mehr auf antikonvulsive Therapie ansprechen, sollte eine chirurgische Intervention in Betracht gezogen werden (Labauge et al., 2007).

Aufgrund der Bedrohung durch im Hirnstamm lokalisierter Kavernome, nehmen diese eine gewisse Sonderstellung ein. Die Mehrzahl der Autoren sah in inzidentell entdeckten Hirnstamm-Kavernomen eine Kontraindikation zur operativen Therapie, es konnte aber nachgewiesen werden, dass die Prognose von Patienten mit Hirnstammkavernomen bei mikrochirurgischer Resektion und individuell gewählten Zugangswegen sich im Vergleich zu Studien der mikrochirurgischen Resektion in den 90er Jahren deutlich verbessert hat (Bertalanffy et al. 1991). Auch andere Gruppen sehen in solitären, zugänglichen Läsionen eine Indikation zur chirurgischen Intervention (Maraire et al., 1995, Bricolo, 2000).

Bei schwangeren Patienten mit kleinen Läsionen, supratentorialer Lokalisation und ohne symptomatische Blutungen, kann eine normale Schwangerschaft und Geburt angestrebt werden. Asymptomatische Patienten mit spinaler Lokalisation eines Kavernoms sollten beobachtet werden, mit symptomatischen Patienten sollte eine Diskussion über die chirurgische Intervention angestrebt werden. Eine antikoagulative Therapie ist bei Patienten mit einem Kavernom möglichst zu vermeiden. Zur Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern liegen keine Daten vor (Labauge et al., 2007).

1.1.7. Prognose

Die Prognose der Patienten mit familiären Kavernomen ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gut untersucht. Alle vorhandenen Studien lassen vermuten, dass die Anzahl der klinischen Ereignisse und das funktionelle Ergebnis nicht mit der Anzahl der Läsionen assoziiert ist sondern mit der Lokalisation der Läsionen. Läsionen im Hirnstamm und in den Basalganglien führen zu einer besonders schlechten Prognose (Zabramski et al., 1994; Labauge et al., 1998; Labauge et al., 2000; Labauge et al., 2001).

1.2. Molekulargenetik des Kavernom

1.2.1. Two-hit Mechanismus

Aufgrund der derzeitigen Forschungsergebnisse wird die Entstehung des Kavernoms durch das von Knudson und Kollegen beschriebene Two-hit Modell, etabliert im

Retinoblastom, erklärt (Knudson et al., 1976; Plummer et al. 2004). Dieses Modell besagt, dass Individuen, welche eine heterozygot vererbte Mutation aufweisen, eine Prädisposition der Krankheitsentstehung haben. Sie benötigen eine zweite somatische Mutation (second hit) zur Entstehung der Erkrankung (Knudson et al., 1976).

Zwei verschiedene Mutationen in *CCM1* wurden in DNA, isoliert aus einem Exzizat eines Patienten mit einer einzigen Läsion und ohne eine familiäre Vorgeschichte des Kavernoms nachgewiesen (Kehrer-Sawatzki et al., 2002). In dem two-hit Modell resultieren zwei Mutationen in einer vaskulären Zelle in einem kompletten Verlust der Funktion von *CCM1*. Diese Zelle expandiert klonal und formt eine Läsion. Vermutlich entstehen multiple Läsionen im familiären Auftreten des Kavernoms aufgrund der vererbten Keimbahnmutation und einer zusätzlichen somatischen Mutation. Multiple Läsionen sind also nicht das Resultat von Metastasen, vielmehr sind die Läsionen ein Mosaik aus normalen Zellen mit nur der Keimbahnmutation und abnormalen Zellen mit der Keimbahnmutation und einem zusätzlichen, somatischen Second-hit (Kehrer-Sawatzki et al., 2002; Knudson, 2001).

1.2.2. CCM1 / KRIT1

Das Gen *CCM1*

Etwa 40%-50% der familiären Fälle des Kavernoms beruhen auf einer Mutation von *CCM1* (Gunel et al., 1996). Etwa 50% dieser Patienten leiden unter neurologischen Symptomen bevor sie das 25. Lebensjahr erreicht haben, während Patienten mit einem sporadisch vorkommenden Kavernom erst deutlich später mit einer Symptomatik auffallen (Denier et al., 2004b).

CCM1 besteht aus 20 Exonen, es ist lokalisiert in der Region 7q11.2-21 und kodiert das Protein KRIT1. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten über 90 Keimbahnmutationen, hauptsächlich nonsense, frameshift oder splice site Mutationen in *CCM1* beschrieben werden, welche in der Regel zu einem vorzeitigen Stopkodon führen (Laberge-le Couteulx et al., 1999; Cavé-Riant et al., 2002; Verlaan et al., 2002; Laurans et al., 2003). Resultat ist ein Funktionsverlust, pathophysiologisch begründet durch den Verfall der mRNA des betroffenen Allels (Labauge et al., 2007).

Das Protein KRIT1

Das von *CCM1* kodierte Krev Interaction Trapped 1 (KRIT1) Protein, enthält konservierte Protein-Protein Interaktionsdomänen, eine NPxY Domäne, vier Ankyrin Repeats und eine C terminale FERM Domäne (s. Abb. 1) (Serebriiskii et al., 1997).



Abb. 1: Schematische Darstellung des von *CCM1* kodierten Proteins KRIT1 (Labauge et al., 2007).

Expression

KRIT1 ist mit gewebespezifischen Variationen und unterschiedlich großen Transkripten in verschiedenen humanen Geweben exprimiert (Laberge-le Couteulx et al., 1999).

Das KRIT1 Protein wurde deutlich exprimiert in vaskulären Endothelzellen während der frühen Angiogenese detektiert, ebenso in Kapillaren und Arteriolen verschiedener humaner Organe, außerdem konnte es in Astrozyten, Neuronen und verschiedenen Epithelzellen im Erwachsenen nachgewiesen werden (Denier et al., 2002; Guzeloglu-Kayisli et al., 2004a; Guzeloglu-Kayisli et al., 2004b).

Kavernom Entstehung in Tierexperimenten

In Tierexperimenten wurde festgestellt, dass homozygot mutierte murine Embryos (*Ccm1*^{-/-}) während der mittleren Gestation sterben. Die vaskulären Defekte, welche diese Embryos aufweisen, waren assoziiert mit einer niedrigen Expression arterienspezifischer Marker, wie *Efnb2*, *Dll4* und *Notch4* (Plummer et al., 2004). Diese Beobachtung führt zur Vermutung, dass KRIT1 wichtig für die arterielle Differenzierung ist und somit der Beginn eines Kavernoms durch eine defekte Arterialisierung herbeigeführt wird. Das Defizit von KRIT1 führt vermutlich zu einer venösen Identität mit anormaler Morphologie (Plummer et al., 2004; Whitehead et al., 2004; Revencu et al., 2006).

Ccm1^{+/-} Mäuse entwickeln keine Kavernome (Plummer et al., 2004). In Mäusen muss eine weitere Mutation bestehen, um Kavernome auszubilden, wie in einer Arbeit mit

Ccm1/Trp53 doppelt mutierten Mäusen gezeigt wurde. *Trp53* der Maus entspricht dem Tumorsuppressor p53 des Menschen. 55% dieser Mäuse (*Ccm1*^{+/-} *Trp53*^{-/-}) weisen zerebrale vaskuläre Malformationen, einschließlich Kavernomen, venösen Malformationen und kapillären Telangiektasien auf. Weder *Trp53*^{+/-} noch *Trp53*^{-/-} Mäuse bekommen vaskuläre Malformationen. Diese Arbeit unterstützt die Two-Hit Hypothese von Knudson, da *Trp53*^{-/-} Zellen eine erhöhte Rate somatischer Mutationen aufweisen (Plummer et al., 2004; Shao et al., 2000).

KRIT 1 als Mikrotubuli-assoziiertes Protein

Mit einem spezifischen anti-KRIT1-Antikörper konnte eine Kollokalisierung von KRIT1 und den Mikrotubuli in Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Lokalisation von KRIT1 an den Plus-Enden der Mikrotubuli in der Mitose scheint eine Rolle im Mikrotubuli-Targeting zu spielen. Diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Interaktion von KRIT1 mit ICAP1 α lassen vermuten, dass KRIT1 eine Rolle in der Bestimmung endothelialer Zellmorphologie spielt und eine Antwort auf Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen durch zytoskeletale Strukturen ist.

Es wurde vorhergesagt dass ein Verlust dieser Targeting-Funktion zu einer anormalen endothelialen Tube-Formation führt, welches somit die sinusoidalen Läsionen des Kavernoms erklärt (Gunel et al., 2002).

1.2.3. CCM2 / Malcavernin

Das Gen *CCM2*

CCM2, auch *MGC4607* besteht aus 10 Exonen, (Denier et al., 2004a; Laurans et al., 2003). Etwa 20% der familiären Fälle des Kavernoms beruhen auf Mutationen in *CCM2* (Craig et al., 1998). Bis heute wurden 8 verschiedene Mutationen festgestellt. Bis auf eine missense Mutation, L198R, wurden entweder frühzeitige Stopcodons oder Deletionen des ersten Exons festgestellt, welche zu einem Funktionsverlust führen (Liquori et al., 2003; Denier et al., 2004a). Die missense Mutation L198R ist in der PTB Domäne von *CCM2* lokalisiert und verhindert eine Interaktion von *CCM1* und *CCM2*, welches ebenfalls zu einem Funktionsverlust führt. (Zawistowski et al., 2005).

Das Protein Malcavernin

CCM2 kodiert das Protein MGC4607, auch Malcavernin oder *CCM2* genannt (Liquori et al., 2003). Es besitzt eine Phosphotyrosin-binding (PTB) Domäne (s. Abb. 2) (Denier et al., 2004a; Laurans et al., 2003).

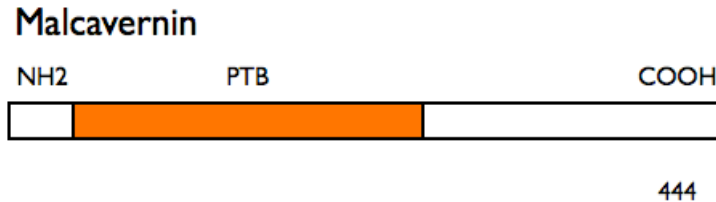


Abb. 2: Schematische Darstellung des von *CCM2* kodierten Protein Malcavernin (Labauge et al., 2007).

Expression von Malcavernin

In Northern Blot Analysen wurde eine hohe Expression von Malcavernin in Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und Leber und eine minimale bis keine Expression in Kolon und Lunge nachgewiesen. Malcavernin ist auch in Gewebe aus dem Gehirn exprimiert (Liquori et al., 2003). Immunhistochemische Analysen zeigten eine Expression von Malcavernin im arteriellen Endothel der Gefäße verschiedener Organe. Es konnte unter anderem im Endothel zerebraler Kapillaren und Arteriolen nachgewiesen werden, während es im Gegensatz zur KRIT1 Expression in den umgebenden Gefäßanteilen wie den glatten Muskelzellen nicht exprimiert war. Malcavernin konnte außerdem nicht in der venösen Zirkulation nachgewiesen werden. Es ist zusätzlich in Pyramidalzellen und in den Fortsätzen der Astrozyten, welche die zerebralen Blutgefäße umgeben, exprimiert (Seker et al., 2006).

CCM2 mRNA konnte auch in HUV Endothelzellen mittels Echtzeit RT-PCR und mittels Western Blot nachgewiesen werden (Seker et al., 2006).

1.2.4. *CCM3* / *PDCD10*

Das Gen *CCM3*

CCM3 wurde ebenso wie *CCM1* und *CCM2* durch Deletionen in Kavernom-Familien identifiziert, nachdem in diesen Familien das Mutationsscreening für *CCM1* und *CCM2* negativ war (Bergametti et al., 2005). Multiloci Linkage Daten lassen vermuten, dass

40% der familiären Kavernom Fälle in Verbindung mit dem *CCM3* Locus stehen (Craig et al., 1998).

Das Protein PDCD10

CCM3 kodiert das Protein PDCD10, programmed cell death 10. Datenbank Analysen ergaben, dass die kodierende Sequenz keine bekannten funktionalen Domänen enthält (s. Abb. 3) (Ma et al., 2007; Bergametti et al., 2005).

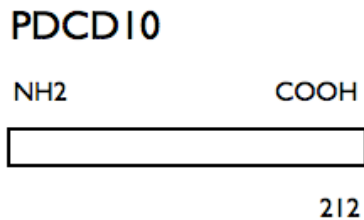


Abb. 3: Schematische Darstellung des von *CCM3* kodierten Protein PDCD10 (Labauge et al., 2007).

Expression

Northern Blot Analysen zeigten eine ubiquitäre Exprimierung von PDCD10. In situ Hybridisierung zeigte eine mRNA Expression in neuronalen Zellen in embryonalen und adulten Stadien (Petit et al., 2006; Plummer et al., 2006).

Tier- und Zellkulturexperimente

Es konnte mehrfach ein Zusammenhang zwischen PDCD10 bzw. *CCM3* und der Apoptose gezeigt werden.

In der humanen, myeloiden Zelllinie TF-1 ist *CCM3* während der Induktion der Apoptose hochreguliert (Bergametti et al., 2005). Andere Gruppen zeigten, dass rekombinantes PDCD10 den natürlichen Zelltod in Fibroblasten bei Exposition von spezifischen Apoptose induzierenden Stoffen, wie Staurosporin, Cycloheximid oder TNF- α inhibiert, was eine antiapoptotische Funktion von PDCD10 vermuten lässt (Wang et al., 1999).

Auch in Fibroblasten vom Brown Bullhead Catfish konnte gezeigt werden, dass das Ortholog von PDCD10 nach Induktion der Apoptose mit Staurosporin hochreguliert ist (Busch et al., 2004).

Genchip Daten zeigten eine Hochregulation von PDCD10 in diversen Tumoren und Tumorzelllinien, was eine entscheidende Rolle dieses Gens in Tumor-Signalwegen vermuten lässt (Huerta et al., 2003; Hu et al., 2003; Chen et al., 2001; Jiang et al., 2001). Unklar bleibt ob PDCD10 den natürlichen Zelltod inhibiert und somit antiapoptotisch wirkt wie die Gruppe um Wang vermuten oder ob es die Apoptose induziert wie es die Gruppe um Plummer vermutet, und somit ein Verlust der Funktion von *CCM3* die Proliferationsrate erhöht (Wang et al., 1999, Plummer et al., 2005). Aufgrund des Zusammenhangs von einer erhöhten Expression von PDCD10 in einigen Tumorzelllinien erscheint eine antiapoptotische Wirkung von PDCD10 wahrscheinlicher, diese ist allerdings nicht belegt.

1.3. CCM Moleküle in ihren Signalwegen

1.3.1. KRIT1 und Malcavernin im β Integrin Signalweg

Es konnte die Interaktion von KRIT1 mit dem Integrin cytoplasmatic domain associated protein 1 α (ICAP1 α) identifiziert werden (Zhang et al., 2001; Zawistowski et al., 2002). ICAP1 α partizipiert im β Integrin Signalweg und vermittelt Zelladhäsion, Migration und Zellproliferation (Bouvard et al., 2006). Die Interaktion von β_1 Integrin und KRIT1 mit ICAP1 α wird über die NPxY Domäne von β_1 Integrin und KRIT1 und die PTB Domäne von ICAP1 α vermittelt. Der Komplex aus KRIT1 und ICAP1 α kann sich zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her bewegen (Zawistowski et al., 2005; Fournier et al., 2005). Darüber hinaus kann ICAP1 α KRIT1 im Nukleus sequestrieren (Zawistowski et al., 2005). Diese Interaktion lässt eine Rolle des Integrin Signalwegs in der Pathogenese des Kavernoms vermuten (Zawistowski et al., 2005).

Malcavernin enthält, wie auch ICAP1 α , eine PTB Domäne, welche eine Interaktion von KRIT1 und Malcavernin zulässt. Es konnte gezeigt werden, dass Malcavernin KRIT1 nach Sorbitol Induktion, also osmotischem Stress, im Zytoplasma sequestriert und sich dieser Komplex an der Zellwand anlagert (Zawistowski et al., 2002; Zawistowski et al., 2005). Die Bildung des Komplexes von KRIT1 und Malcavernin stellt keine kompetitive Komponente zu dem Komplex aus KRIT1 und ICAP1 α dar, da Malcavernin und KRIT1

über die PTB Domäne von Malcavernin binden und im Gegensatz dazu KRIT1 und ICAP1 α über das NPxY Motif von KRIT1 binden. Eine ICAP1 α Überexpression verhindert die KRIT1 Malcavernin Bindung nicht. Darüber hinaus konnte das Vorhandensein eines Dreifach-Komplexes von KRIT1, Malcavernin und ICAP1 α nachgewiesen werden (Zawistowski et al., 2005). Allerdings scheinen KRIT1 und β_1 Integrin um den gleichen Bindungspartner, ICAP1 α zu konkurrieren (Zhang et al., 2001).

ICAP1 α und Zellproliferation

ICAP1 α enthält eine „nuclear localization sequenze“ (NLS), welche die Bewegung von ICAP1 α zusammen mit KRIT1 aus dem Zytoplasma in den Zellkern, und das Verbleiben im Zellkern ermöglicht (s. Abb. 4). Eine Deletion in dieser NLS verhindert dementsprechend die Lokalisation dieser Proteine im Zellkern. Dies resultiert in einer reduzierten Zellproliferationsrate. ICAP1 α im Zellkern stimuliert somit, bei Lokalisation im Zellkern, die Zellproliferation. Eine Überexpression von β_1 Integrin verhindert ebenfalls eine Kernlokalisierung von ICAP1 α , da wie oben beschrieben, KRIT1 und β_1 Integrin um die Bindung mit ICAP1 α konkurrieren (Fournier et al., 2005).

Der zugrunde liegende Mechanismus der Stimulation der Zellproliferation durch ICAP1 α ist nicht geklärt. Es wird vermutet, dass der c-Myc Promotor stimuliert wird (Fournier et al., 2005).

Auch in *Icap1*^{-/-} Mäusen konnte eine reduzierte Proliferationsrate nachgewiesen werden (Fournier et al., 2005).

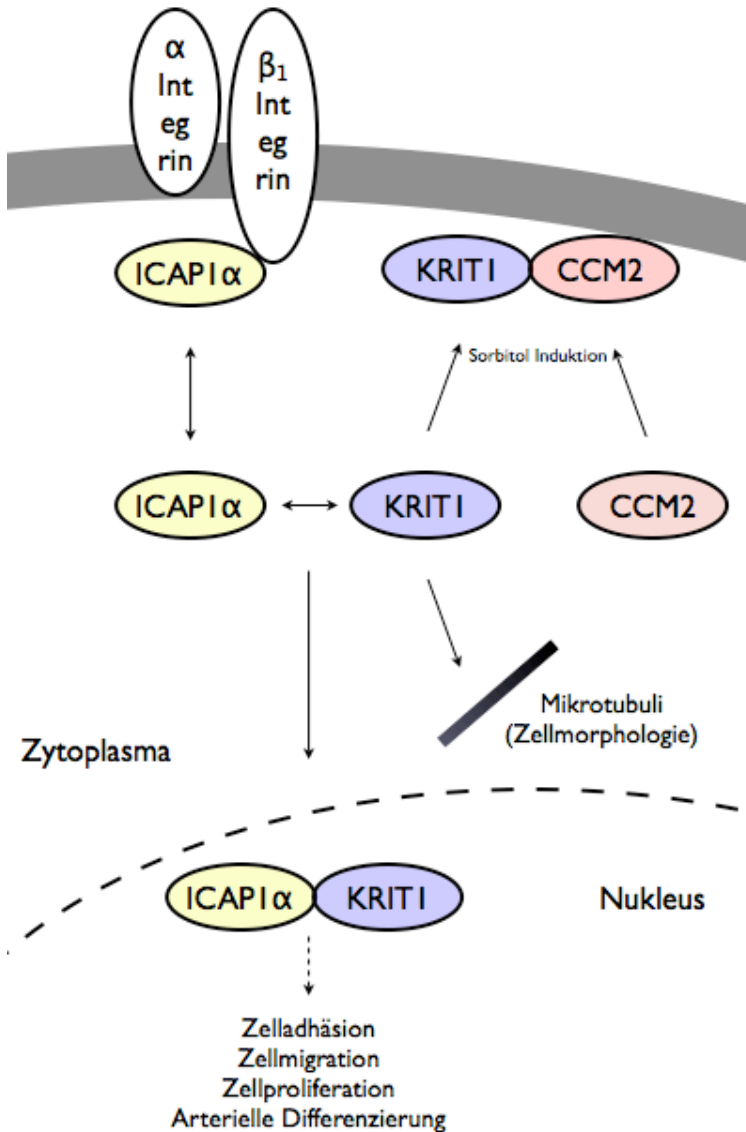


Abb. 4: Schematische Darstellung der Interaktion von β_1 Integrin und KRIT1 mit ICAP1 α und der Interaktion von KRIT1 und Malcavernin (CCM2). ICAP1 α sequestriert KRIT1 im Nukleus, während die Bindung von ICAP1 α an β_1 Integrin diese Sequestrierung verhindert (Revenu et al., 2006). Malcavernin hingegen sequestriert KRIT1 im Zytoplasma (Revenu et al., 2006). KRIT1 hat eine Mikrotubuli-Targeting-Funktion, welche vermutlich die Zellmorphologie beeinflusst (Gunel et al., 2002). Aufgrund von Forschungsergebnissen in Mäusen wird vermutet, dass KRIT1 eine kritische Rolle in der arteriellen Differenzierung spielt (Whitehead et al., 2004).

Die einzige *CCM2* missense Mutation, über die berichtet wurde, L198R, ist in der PTB Domäne lokalisiert und verhinderte diese Interaktion von KRIT1 und Malcavernin. (Denier et al., 2004a). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ein Verlust der Interaktion von KRIT1 und Malcavernin zu der Pathogenese des Kavernoms beiträgt,

möglicherweise aufgrund des Einflusses auf die Bewegung zwischen Nukleus und Zytoplasma von KRIT1 (Zawistowski et al., 2005).

1.3.2. Aktivierung von p38MAPK

Der Komplex aus KRIT1 und Malcavernin (CCM2) konnte außer im Zusammenhang mit der Sequestrierung im Zytoplasma auch in einem Dreifachkomplex zusammen mit MEKK3 mittels Immunoprecipitation nachgewiesen werden (Zawistowski et al., 2005). Funktionell faltet Malcavernin unter osmolarem Stress RAC1, ein Protein kritisch für die lokale Aktin Organisation von Zelloberflächenstrukturen, welches daraufhin über MEKK3 und MKK3 p38MAPK durch Phosphorylierung aktiviert (s. Abb. 5) (Uhlik et. al., 2003).

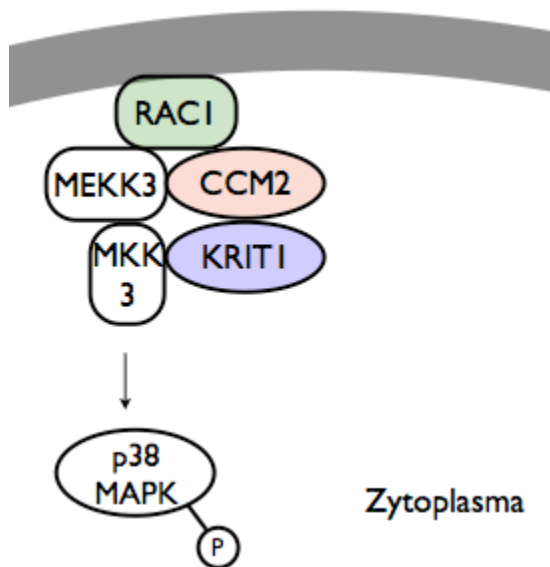


Abb. 5: KRIT1, Malcavernin (CCM2) und MEKK3 wurden im Dreifachkomplex nachgewiesen (Zawistowski et al., 2005). Die Abbildung zeigt ein molekulares Model der Aktivierung von p38 MAPK mittels Posphorylierung durch die Faltung von RAC1 im RAC1/MEKK3/MKK Komplexe ausgelöst von Malcavernin (CCM2) (Zawistowski et al., 2005; Plummer et al., 2005).

RAC1 interagiert außerdem mit ICAP1 α , welches im Komplex mit β_1 Intergrin RAC1 negativ reguliert (Degani et. al., 2002). KRIT1 im Komplex mit ICAP1 α hingegen ist ein positiver Modulator der RAC1 Aktivität (s. Abb. 6) (Zhang et al., 2004).

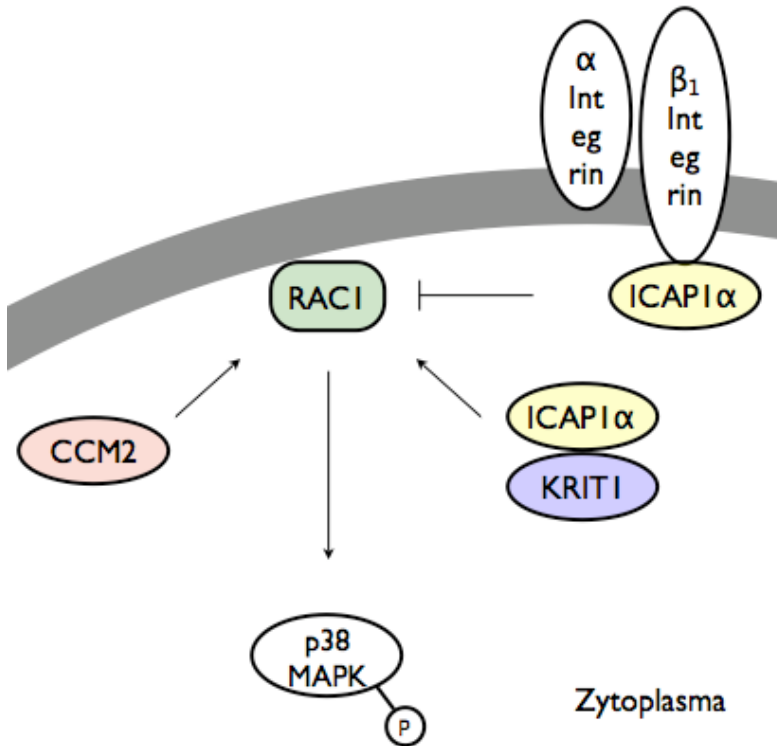


Abb. 6: Molekulares Model der Aktivierung von p38MAPK durch die Regulation von RAC1 durch KRIT1, Malcavernin (CCM2) und ICAP1 α . KRIT 1 ist vermutlich ein Modulator von ICAP1 α (Degani et al., 2002; Zhang et al., 2004 Plummer et al., 2005; Uhlik et al., 2003).

Murine Forschungsergebnisse zeigen, dass Mäuse ohne Mekk3 oder p38 α Map Kinase signifikante Defekte in der plazentalen Angiogenese und in der Entwicklung der Blutgefäße, besonders im Bereich des Kopfes, aufweisen (Mudgett et al., 2000; Adams et al., 2000; Yang et al., 2000).

1.3.3. Aktivierung des ERK Signalweges

Es wurde gezeigt, dass PDCD10 mit der Ste20-related Kinase MST4 interagiert. Diese physiologische Interaktion vermehrt die MST4 Kinase Aktivität und fördert somit Zellwachstum und Transformation via Modulation des ERK Signalweges. PDCD10 scheint ein positiver Regulator von MST4 zu sein (s. Abb. 7). Genchip Daten von PDCD10 zeigen veränderte Expressionen in Tumorgewebeproben und lassen eine Rolle in der Tumorangio-genese und der Tumorprogression vermuten (Ma et al., 2007).

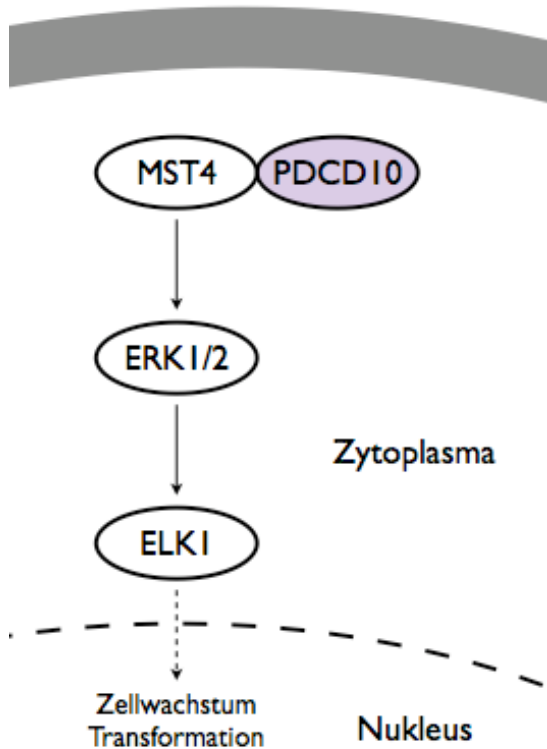


Abb. 7: MST4 aktiviert ERK1/2 und ELK1. PDCD10 interagiert mit MST4 und moduliert die ERK MAPK Kaskade. Eine Interaktion mit p38MAPK konnte nicht nachgewiesen werden (Ma et al., 2007).

Da die Phänotypen von Patienten mit Mutationen in *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* sehr ähnlich zu sein scheinen, ist die Funktion von PDCD10 wahrscheinlich sehr nah mit den Funktionen von KRIT1 und Malcavernin verbunden. Allerdings konnte noch keine Interaktion des Integrin und des p38MAPK Signalwegs mit dem ERK Signalweg, in welchen PDCD10 eingebunden ist, nachgewiesen werden (Revenu et al., 2006). *Short interfering RNA* (siRNA) Experimente zeigten, dass PDCD10 und MST4 p38MAPK nicht regulieren (Ma et. al., 2007).

1.3.4. KRIT1 und RAP1A

In einem Yeast two hybrid Screen wurde gezeigt, dass KRIT1 mit dem Ras-related protein 1A (RAP1A) interagiert. RAP1A gehört zu der RAS-Familie der Guanosin Triphosphate. Diese Interaktion lies eine Verbindung zu dem RAS Tumorsuppressor Signalweg vermuten (Serebriiskii et al., 1997; Zawistowski et al., 2002). Es konnten allerdings weitere Exone von KRIT1 nachgewiesen werden, welche den N-Terminus des

Proteins um 207 Aminosäuren verlängerten (Zhang et al., 2001). KRIT1 in seiner ganzen Länge zeigte keine Interaktion mit RAP1A, allerdings zeigte sich die zuvor beschriebene Interaktion mit ICAP1 α (Zhang et al., 2001).

Auch der reziproke Yeast two-hybrid Screen zeigte keine Interaktion. Es bestehen keine weiteren Hinweise, dass RAP1A eine Rolle in der Pathogenese des Kavernoms spielt (Marchuk et al., 2003).

1.4. Fragestellung

Kavernome, vaskuläre Neubildungen des zentralen Nervensystems, weisen eine Prävalenz von 0,5% auf. Das Auftreten des Kavernoms kann durch sporadische oder Keimbahnmutationen bedingt sein. Die familiären Formen des Kavernoms stehen im Zusammenhang mit drei chromosomalen Loci: Chromosom 7q (*KRIT1/CCM1*), Chromosom 7p (*MGC4607/CCM2*) und Chromosom 3q (*PDCD10/CCM3*), deren Mutationen in einem Funktionsverlust dieser Gene resultieren. Nahezu das gesamte Vorkommen familiärer Fälle des Kavernoms in der Population mexikanisch stämmiger US Amerikaner gründet sich auf Mutationen im Gen *CCM1*, während in anderen Populationen Mutationen in diesem nur für etwa 40-50% der familiären Fälle verantwortlich sind.

Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass KRIT1 in den β Integrin Signalweg eingebunden ist, welcher eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion (outside-in signaling) spielt. Der β Integrin Signalweg reguliert Zelladhäsion, Zellproliferation und arterielle Differenzierung in humanen Zellen.

Wie sich in den familiären Fällen der Kavernome zeigt, spielt ein Funktionsverlust der *CCM* Gene in der Entwicklung des Kavernoms eine wesentliche Rolle. Die vorliegende Arbeit soll den Nachweis der Expression der mRNA von *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* in HUV Endothelzellen erbringen. Sollte dieser Nachweis mittels Echtzeit RT-PCR nicht möglich sein, würde dies die Theorie widerlegen, dass die Endothelzelle eine zentrale Rolle in der Entstehung des Kavernoms spielt.

Darüberhinaus soll ein System zur Verminderung der Expression von *CCM1* in HUV Endothelzellen mittels Transfektion mit *short interfering RNA* etabliert sowie die daraus

resultierenden morphologischen und proliferativen Veränderungen der Endothelzellen erfasst werden. Diese sollen die heute bekannten Erkenntnisse unterstützen und zum weiteren Verständnis der Entstehung des Kavernoms beitragen.

2. Material und Methoden

Unter 2.1. und 2.2. werden alle Materialien und Geräte aufgelistet, die für diverse Methoden bzw. für die alltägliche Arbeit in der Zellkultur eingesetzt wurden, während die Materialien und Geräte, welche nur für eine bestimmte Methode benutzt wurden, nach der jeweiligen Methode aufgeführt sind.

2.1. *Allgemeine Geräte und Materialien*

Wasser

Sartorius Arium, Reinstwassersystem	Vitaris, Baar CH
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen

Zentrifugen

Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Rotina 38	Hettich, Bäch CH

Reaktionsgefäße

50ml Cellstar PP-test tubes	Greiner bio-one, Solingen
15ml Röhre 120x17mm PP	Sarstedt, Nürnberg
1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg

2.2. *Allgemeines Material in der Zellkultur*

Zelllinie

Human Umbilical Vein Endothelial Cells	
HUVEC-C cryo preserves cells 1ml cryo-smf	PromoCell, Heidelberg

Medien für die Zellkultur

Endothelial Cell Growth Medium, low Serum	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg

Die Herstellung des Vollmediums wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Puffer, Lösungen und Chemikalien für die Zellkultur

10xPBS (1 Liter)

- | | | |
|---------|---|------------------------|
| • 80g | NaCl | Riedel-de Haën, Seelze |
| • 2g | KCl | Merck, Darmstadt |
| • 26,8g | Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | Merck, Darmstadt |
| • 2,4g | KH ₂ PO ₄ | Merck, Darmstadt |

NaCl, KCl, Na₂HPO₄·7H₂O und KH₂PO₄ wurden in 800ml H₂O gelöst und mit HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde auf einen Liter mit H₂O aufgefüllt, aliquotiert und autoklaviert. Das 10x PBS wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Vor Benutzen wurde das 10x PBS auf 1x PBS mit H₂O verdünnt und dann bei 4°C aufbewahrt. Zur Herstellung des HEPES Puffers wurden depyrogenisierte Glaswaren und Werkzeuge verwendet.

HEPES Puffer (1 Liter)

- | | | |
|------------|---|--------------------------|
| • 1,802g | Glukose | Merck, Darmstadt |
| • 7,697g | NaCl | Riedel-de Haën, Seelze |
| • 268,2mg | Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | Merck, Darmstadt |
| • 224,0mg | KCl | Merck, Darmstadt |
| • 7,149g | HEPES | Sigma, Osterode am Harz |
| • 100,0 mg | Phenolrot | Sigma , Osterode am Harz |

Glukose, NaCl, Na₂HPO₄·7H₂O, KCL, HEPES und Phenolrot wurden in 800ml H₂O gelöst und mit HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde auf einen Liter mit H₂O auf einen Liter aufgefüllt, und durch Filtration (0,1µm) sterilisiert. Aliquotiert wurde die Lösung dann lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Zur Herstellung des HEPES Puffers wurden depyrogenisierte Glaswaren und Werkzeuge verwendet.

Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin
0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}	
HCL 32,6%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe

Verbrauchsmaterialien Zellkultur

Cellstar Tissue culture flasks 75cm ²	Greiner bio-one, Solingen
Cellstar Tissue culture flasks 25cm ²	Greiner bio-one, Solingen
Cell Culture Dish	Becton Dickinson, Heidelberg
Easy Grip, standard tissue-culture treated 35x10mm dish	
Cellstar TC-Plate 24well	Greiner bio-one, Solingen
Cryotube vials 1,8ml	Nunc, Roskilde DK

2.3. Allgemeine Methoden in der Zellkultur

Die Arbeiten mit Säugerzellkulturen wurden im wesentlichen nach Standardmethoden, wie sie z.B. bei Spector, 1998 beschrieben sind, durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in Adhäsionskultur auf Zellkulturschalen, Zellkulturflaschen und auf 24well-Platten kultiviert. Die Zellen wurden in Vollmedium in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Zu dem Wasser im Wasserbad des Inkubators wurde Kupfer(II) Sulfat-Pentahydrat gegen Pilze, Bakterien und Algen hinzugegeben. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Steril-Arbeitsbank durchgeführt. Das Aufwärmen des Mediums wurde zur Anpassung der Temperatur und des pH Wertes im Brutschrank oder im 37°C warmen Wasserbad mit deionisiertem Wasser und Thermoklar Zusatz durchgeführt.

DH autoflow CO ₂ jacketed Incubator	NuAire, Plymouth USA
CuSO ₄ +5H ₂ O	Merck, Darmstadt
Microflow, laminar flow cabinet	MDH limited, Hampshire GB
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Thermoklar Zusatz	Biomed, Oberschleißheim

2.3.1. Einfrieren von Zellen

Um Säugerzellen über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurden diese in einem Einfriermedium, welches die Bildung von Eiskristallen und somit die irreversible Schädigung der Zellen verhindert, langsam abgekühlt und dann bei -173°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zunächst wurden die Zellen trypsinisiert und nach Neutralisation durch das Vollmedium bei 500g in einem 15ml Reaktionsgefäß in einer Zentrifuge 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 37°C warmen Einfriermedium, eingestellt auf eine Zellzahl von 1 Mio. Zellen in einem ml, resuspendiert. 500µl Aliquots der Zellsuspension wurden in Cryo Vials überführt. Anschließend wurden diese im auf 4°C Isopropanol enthaltenden Mr. Frosty mit 1°C Abkühlung pro Minute bis auf -80°C gekühlt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Cryo Vials dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium

- 70% Vollmedium
- 20% FCS
- 10% DMSO

Fetal calf serum (FCS)

Invitrogen, Karlsruhe

Dimethyl sulphoxide (DMSO) HYBRI-Max

Sigma, Osterode am Harz

Mr. Frosty Cryo 1°C freezing container

Nalgene, Hereford GB

2.3.2. Auftauen von Zellen

Um Zellschädigungen beim Auftauen von Säugerzellen zu vermeiden, wurden die auf -173°C in Cryo Vials gelagerten Zellen in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad überführt und soweit aufgetaut, dass die Zellsuspension gerade wieder flüssig wurde. Die Zellsuspension wurde resuspendiert und in eine 75cm² Flasche mit 30min im Brutschrank vorgewärmten Vollmedium überführt. 24 Stunden nach der Aussaat wurde ein vollständiger Medienwechsel durchgeführt um das verbliebene DMSO zu entfernen.

2.3.3. Passagieren von Zellen

Die HUV Endothelzellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 90% 1:3 verdünnt und auf neuen 75cm² Zellkulturflaschen ausplattiert. 90% Konfluenz der HUV Endothelzellen entspricht etwa einer Zellzahl von 1,8 Mio. Zellen. Je nach Versuch wurden die Zellen auch in gewünschter Zellzahl in 25cm² Flaschen, in 3,5cm Zellkulturschalen oder in 24well Platten ausplattiert.

Nach Absaugen des Mediums wurden die adhärennten Zellen zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen. Darauf folgend wurden sie durch Zugabe von 4ml einer 1:10 Trypsin-EDTA Lösung in 75cm² Zellkulturflaschen bzw. durch Zugabe von 1ml einer 1:10 Trypsin-EDTA Lösung auf Zellkulturschalen und einer Inkubationszeit von circa 10 min bei Raumtemperatur von der Zellkulturflasche bzw. der Zellkulturschale vollständig gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Vollmedium resuspendiert und in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt, die Flasche bzw. Schale wurde mit HEPES einmal gewaschen und der Überstand wurde ebenfalls in das Gefäß überführt.

Diese Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 500g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden je nach gewünschter Endverdünnung, in einer bestimmten Menge Vollmedium resuspendiert und in vorbereiteten Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturschalen überführt. Die Zellen wurden mit frischem Medium auf die Endmenge Medium verdünnt.

2.3.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl für die allgemeinen Methoden in der Zellkultur wurde mit einer Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1mm bestimmt. Dazu wurde auf das Zählgitter der Kammer ein Deckglas so aufgebracht, dass Newton'sche Ringe erkennbar waren. Die Zellen wurden trypsinisiert, in einem definierten Volumen in Medium aufgenommen und auf die Zählkammer unter das Deckglas pipettiert. Anschließend wurde die Zellzahl in 4x16 Feldern ausgezählt und hieraus der Mittelwert berechnet. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit 1×10^4 erhielt man die Angabe der Zellzahl pro ml.

2.4. Transiente Transfektion mittels GeneSilencer™ siRNA Transfection Reagent

RNA Interference ist eine effektive Möglichkeit, bestimmte Genexpressionen in kultivierten Säugerzelllinien runter zu regulieren. Sequenzspezifische doppelsträngige RNA wird in die Zellen eingeführt und degradiert zielgerichtet die spezifische mRNA, wodurch eine Proteinsynthese verringert oder verhindert wird.

„GeneSilencer™ siRNA Transfection Reagent“ ist ein auf kationischen Lipiden basierendes Reagenz, welches zu einer Liposomen-vermittelten Transfektion führt. RNA wird in künstlichen Lipidvesikeln eingeschlossen, welche dann mit der Plasmamembran verschmelzen und ihren Inhalt in das Zytosol abgeben (Strachan et al., 2004).

24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von 10 000 Zellen pro cm² ausplattiert. Die Transfektion wurde mit einer siRNA Konzentration von 70nM durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Transfektion einmal mit reinem Medium ohne Supplement Mix gewaschen und danach wurde zu den Zellen Medium ohne das Supplement hinzugegeben. Vier Stunden nach der Transfektion wurde Medium mit der doppelten Menge an Supplement hinzugegeben, so dass das von PromoCell vorgesehene Verhältnis von Medium zu Supplement wieder gegeben ist. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium mit den Transfektionsagenzien gegen frisches Vollmedium ausgetauscht. 48, 72 und 96 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und validiert bzw. funktionell untersucht.

GeneSilencer™ siRNA Transfection Reagent

GTS Inc., Gene Therapy Systems,
Inc. San Diego, USA

2.4.1. short interfering RNA

Die siRNAs sind von der Firma Ambion, Darmstadt validierte *short interfering RNAs*.

validated siRNA: silencer negative control #1

validated siRNA: CCM1 #15469

validated siRNA: CCM1 #15655

2.5. Echtzeit RT-PCR

2.5.1. Ernte des Zellpellets

Zur Ernte des Zellpellet wurden die Zellen mit 4°C kaltem PBS gewaschen und dann mit einer geringen Menge PBS von der Platte gekratzt und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden die Zell Scraper vor Benutzung in Ethanol gelagert, darauf folgend mindestens 10min mit H₂O₂ behandelt und anschließend mit Aqua ad injectabilia abgespült.

Disposable Cell Scraper
H₂O₂

Greiner bio-one, Solingen
Merck, Darmstadt

2.5.2. RNA Isolation

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde das „NucleoSpin[®] RNAII Kit“ benutzt. Das zuvor geerntete Zellpellett wurde in 350µl Lysepuffer und 3,5µl β-Mercaptoethanol lysiert. Die RNA wurde nach einer reinigenden Filtration in einer Silica Membran gebunden. Diese wurde entsalzen und mit DNase behandelt, daraufhin mehrmals gewaschen und mit RNase freiem Wasser eluiert. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch. Über das Verhältnis A260/280nm wurde die Reinheit der Probe, um einer Verfälschung der Konzentration vorzubeugen ermittelt. Die in Wasser gelöste RNA wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für längere Aufbewahrungszeiten wurde RNA mit Isopropanol gefällt und als Pellet gelagert.

NucleoSpin RNAII
β-Mercaptoethanol
GeneQuant II RNA/DNA Calculator
Isopropanol

Macherey-Nagel, Düren
Sigma, Osterode am Harz
Amersham Bioscience,
Piscataway USA
Riedel-de Haën, Seelze

2.5.3. Reverse Transkription

Die *reverse Transkription* wurde mit dem „First Strand cDNA Synthesis“ nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Es wurden 0,35 bis 0,5µg totale RNA und 1µl des Random Hexamer Primers eingesetzt.

Die RNA wurde mit dem Primer und 11µl RNase freiem Wasser 5min bei 70°C denaturiert. Danach wurden zum Reaktionsansatz 4µl 5x Reaction Puffer, 1µl RiboLock Ribonuclease Inhibitor, und 2µl dNTP-Mix hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 5min bei 25°C inkubiert und schließlich wurden 2µl M-MuLV reverse Transkriptase zu einem Endvolumen von 20µl hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde zur Bindung der Primer und zur anschließenden cDNA Synthese 10min bei 25°C, dann 60min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Ansatz für 10min bei 70°C inkubiert. Nach Abschluss dieser Schritte wurde die cDNA in dem gesamten Reaktionsansatz bei -20°C gelagert.

First Strand cDNA Synthesis Kit

Fermentas, St. Leon-Rot

Peltier thermal cycler PTC-200

MJ Research, Waltham USA

2.5.4. Primer

Die Primer wurden mittels der Universal Probe Library von der Firma Roche, Mannheim entworfen und von der Firma Invitrogen, Karlsruhe synthetisiert (s. Tab. 1)

Primer	Sequenz	In PCR eingesetzte
		Menge in μ l
CCM1 forward	TGAAGGAAGCAATTAACAAACCA	0,5
CCM1 reverse	GAGAGACGCATTTCCTTCCAT	0,5
CCM2 forward	CCCTGTCTGGAGAGTGCAG	1
CCM2 reverse	AGCAGACAGCAAAGCTCCTC	1
CCM3 forward	TGGCAGCTGATGATGTAGAAG	0,5
CCM3 reverse	TCGTGCCTTTTCGTTTAGGT	0,5
GAPDH forward	AGCCACATCGCTCAGACA	1
GAPDH reverse	GCCCAATACGACCAAATCC	1

Tab. 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Die Primer Stock Lösung wurde auf 100 μ M mit Wasser eingestellt. Die in der Echtzeit RT-PCR eingesetzte Verdünnung war eine Verdünnung der Stocklösung von 1:10 entsprechend einer 10 μ M Lösung.

Bei der Auswahl der Primer wurde sichergestellt, dass jedes Transkript des jeweiligen Gens mit dem Primerpaar erfasst wird.

2.5.5. Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

Die Echtzeit RT-PCR ist eine Form der quantitativen PCR, bei welcher eine Fluoreszenz detektierende Thermocycler Maschine simultan zur Amplifikation der spezifischen Nukleinsäure Sequenzen die Konzentration misst. Somit lässt diese Methode die Expressionsanalyse spezieller Gene zu.

Zu dem Echtzeit RT-PCR Ansatz wird ein fluoreszierender Farbstoff hinzugegeben, welcher nur fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA bindet. Je mehr doppelsträngiges PCR Produkt gebildet wird, umso mehr Fluoreszenz wird emittiert. Es entstehen Amplifikationskurven, die Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA respektive auf die Startmenge der mRNA zulässt. Dabei ist der Ct Wert das Maß für die Quantifizierung der Startmenge. Er entspricht der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am

Ct befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Bei einer Effizienz der PCR von 100% verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer Ct entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA, dementsprechend der mRNA Startmenge (Pfaffl, 2004).

In dieser Arbeit wurde ein SYBR Green Mix verwendet, welcher eine hitzeresistente Polymerase enthält. Zur Aktivierung benötigt diese initial einen 15 Minuten Schritt bei 95°C. Die Echtzeit RT-PCR wurde in einem iCycler der Firma Bio Rad mit dem in Tabelle 2 dargestellten Programm durchgeführt.

Temperatur	Zyklen	Dauer des Zyklus	Beschreibung
95°C	1x	15 min	Aktivierung der Polymerase, DNA Denaturierung
95°C	35x	30 s	DNA Denaturierung
X °C		30 s	Primer Anlagerung
72°C		50 s	Amplifikation
72°C	1x	30 s	Amplifikation
95°C	1x	1 min	DNA Denaturierung
55°C	1x	1 min	
55°C	80x	10 s Erhöhung je Zyklus um 0,5°C	Erstellung der Schmelz Kurve
10°C	1x	hold	kurzzeitige Lagerung

Tab. 2: Echtzeit RT-PCR Programm. Das Programm besteht aus sieben Schritten, wobei der zweite Schritt sich in drei Einzelschritte aufteilt, die in aufgelisteter Reihenfolge 35-fach wiederholt werden. Die Temperatur X ist individuell für jedes Primerpaar etabliert worden und in der Tab. 5 aufgeführt.

Die Echtzeit RT-PCR wurde in 25µl Gesamtvolumen durchgeführt. Pro Ansatz wurden 1 bis 2µl cDNA eingesetzt. Für die Amplifikation der cDNA wurden 35 Zyklen durchlaufen. Die Anlagerungstemperatur (X) betrug je nach verwendetem Primerpaar zwischen 58°C und 60°C (s. Tab.3). Für die Echtzeit RT-PCR wurden für jedes Primerpaar die PCR Bedingungen neu optimiert, so dass die Menge des Endprodukts im

linearen Bereich lag und eine semiquantitative Analyse der Expression spezifischer Gene möglich war.

Gen	Anlagerungstemperatur (X)	Fragmentgröße (Basenpaare bp)
CCM1	60°C	130bp
CCM2	59°C	97bp
CCM3	58°C	77bp
GAPDH	58°C	66bp

Tab. 3: Tabelle der Parameter der Primerpaare

Zur Etablierung der Echtzeit RT-PCRs wurde von jedem Ansatz nach der Echtzeit RT-PCR-Reaktion ein Aliquot von 12µl entnommen und auf einem 2%igen Ethidiumbromid haltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert. Dieses erfolgte, um unspezifische Banden und Dimerisierung der Primer zu detektieren, welche das Ergebnis verfälschen können.

Der Schwellenwert zur Bestimmung des Ct Wertes wurde automatisch von dem iCycler bestimmt, es wurden in keinem Fall Nachkorrekturen gemacht.

Zur statistischen Auswertung der Echtzeit RT-PCR Ergebnisse wurde die relative Quantifizierung angewandt. Das zu untersuchende Gen wurde auf das Referenzgen normalisiert und ohne Effizienz Korrektur nach der $2^{(-\Delta\Delta C_P)}$ Methode berechnet (Pfaffl, 2004).

iCycler	BioRad, München
Absolut qPCR SYBR Green Mix	ABgene, Hamburg
Thin-wall 8-tube strip, farblos high profile	Biozym, Hess. Oldendorf
Optical 8-cap strip, farblos	Biozym, Hess. Oldendorf

Agarosegel 2%

- 2g Agarose
- auf 100ml mit 1xTAE Puffer auffüllen
- 4-8µl Ethidiumbromid

Agarose und 1xTAE wurden erhitzt, so dass eine homogene Lösung entstand. Es wurden zwischen 4 und 8µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gegossen und man ließ es mind. 20 min abkühlen.

Top Vision LM GQ Agarose

Fermentas, St. Leon-Rot

Ethidium bromide solution $C_{12}H_{20}BrN_3$

Sigma, Osterode am Harz

50xTAE Puffer (1Liter)

- 242g Tris in 500ml H_2O
- 100ml 0,5M Na EDTA (pH 8,0)
- 57,1ml Eisessig
- auf 1 Liter mit H_2O auffüllen
- Aufbewahrung bei Raumtemperatur

Agagel Gel Electrophoresis Apparatus
without cooling standard

Biometra, Göttingen

Electrophoresis Power supply EPS601

Amersham Bioscience,
Piscataway USA

UV Solo

Biometra, Göttingen

Gene ruler DNA ladder 50bp ready to use

Fermentas, St. Leon-Rot

2.6. Morphologie

Die Beurteilung der Morphologie der transfizierten Zellen wurde zu vorgegebenen Zeiten über die Beobachtung mittels Mikroskop gemacht. Diese Beobachtungen wurde mittels Photographie festgehalten.

Mikroskop Leitz Epivert
Camera Power Shot S30

Leitz, Wetzlar
Canon, Krefeld

2.7. Proliferationsassay

Die Zellzahl für den Proliferationsassay wurde mittels Coulter-Count Technik bestimmt. Die Zellen wurden 2x mit HEPES gewaschen, mit 500µl trypsinisiert und durch mehrmaliges hin und her pipettieren vollständig in ein Zählgefäß mit 9,5ml Isoton II Lösung überführt und resuspendiert. An dem Coulter Count Gerät wurde die Zellsuspension ein weiteres Mal durchmischt und darauffolgend die Zellzählung durchgeführt. Der Faktor zur Umrechnung der Zählereignisse in Zelldichte (Zellen pro cm²) errechnet sich aus dem Quotient der Summe des Volumens der Isoton-II Lösung (V) und des Volumens der Zellsuspension (Z) durch das Produkt des analysierten Volumens der Zellsuspension (A) und der Fläche der Petrischale (F).

$$Faktor = \frac{V + Z}{A \cdot F}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der Zellzahl mittels Coulter Count Technik.

Es wurde eine Petrischale mit einem Durchmesser von 35mm (9,6cm²) benutzt, und das Volumen der Zellsuspension und das analysierte Volumen betrug jeweils 0,5ml, woraus sich ein Faktor von 2,083 ergibt. Zur exakten Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 4 Platten dreifach bestimmt. Diese wurden mit der oben genannten Formel berechnet und es wurde der Mittelwert und dessen Standardabweichung berechnet. Der Versuch ist dreifach reproduziert worden.

Coulter Count diluent Isoton II diluent
Z1 Coulter Counter

Beckman Coulter, Krefeld
Beckman Coulter, Krefeld

3. Ergebnisse

3.1. *Expression der CCM Gene in HUV Endothelzellen*

Funktionsverluste der Gene *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Kavernoms.

Im Folgenden wird der qualitative Nachweis mittels Echtzeit RT-PCR dieser drei Gene in HUV Endothelzellen erbracht. Die Echtzeit RT-PCR weist cDNA nach, welche eine direkte Abschrift der mRNA ist und somit die Expression dieser Gene widerspiegelt.

Zur Etablierung der Echtzeit RT-PCR wurden jeweils 1:1 und 1:10 Verdünnungen der cDNA der drei Gene benutzt.

Der *Threshold*, auch bezeichnet als Schwellenwert, wurde in jedem Ergebniss maschinell vom iCycler berechnet und vorgegeben. Es wurden in keinem Fall Nachkorrekturen vorgenommen.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1. bis 3.1.3 konnten alle dreifach reproduziert werden.

3.1.1. **CCM1**

Wie in der Abbildung 8 gezeigt, konnte die Expression von *CCM1* in HUV Endothelzellen nachgewiesen werden. Dieser Nachweis stellt als quantitative Messung in den weiteren Versuchen mit siRNA die Methode der Validierung dar. Die Amplifikationskurve der *CCM1* Echtzeit RT-PCR zeigt einen deutlich früheren Anstieg bei Ct 21,35 der HUV Endothelzellen 1:1 Verdünnung im Vergleich zur HUV Endothelzellen 1:10 Verdünnung mit einem Ct von 24,35. Die Negativkontrolle zeigt keine Amplifikation.

Ergebnisse

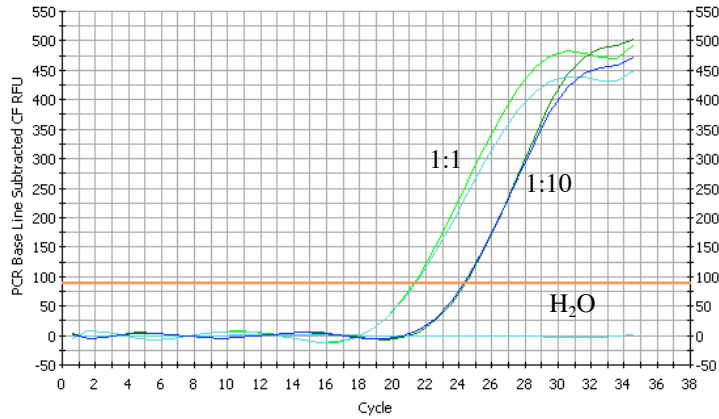


Abb. 8: Echtzeit RT-PCR Amplifikationskurve von *CCMI* einer 1:1 Verdünnung aus HUV Endothelzellen, einer 1:10 Verdünnung aus HUV Endothelzellen und einer H₂O Negativkontrolle.

Probe	Ct Wert
HUVEC 1:1 Probe 1	21,3
HUVEC 1:1 Probe 2	21,4
HUVEC 1:10 Probe 1	24,4
HUVEC 1:10 Probe 2	24,3
H ₂ O Probe	Keine Amplifikation

Tab. 4: Ct Werte nach Etablierung der Echtzeit RT-PCR für *CCMI* der in Abb. 9 gezeigten Amplifikationskurve.

Die Schmelzkurve für die HUV Endothelzell-Proben zeigt einen einzigen, für dieses Primerpaar spezifischen Ausschlag bei 82,5°C. Es zeigt sich keine unspezifische Amplifikation. Die Negativkontrolle weist keine Amplifikation auf (s. Abb. 9).

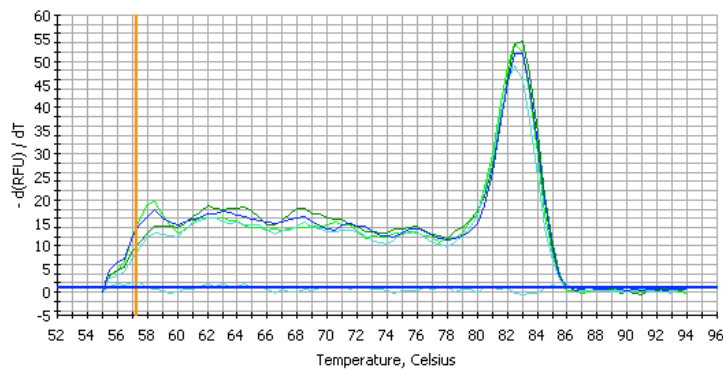


Abb. 9: Echtzeit RT-PCR Schmelzkurve von *CCMI* einer 1:1 Verdünnung aus HUV Endothelzellen, einer 1:10 Verdünnung aus HUV Endothelzellen und einer H₂O Negativkontrolle.

Die Endprodukte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, um die Größe des Produktes und ein weiteres Mal die Spezifität des Produktes zu überprüfen. Es zeigen sich neben den erwarteten Banden keine weiteren Banden. Die Stärke der Banden in der 1:1 und der 1:10 Verdünnung sind annähernd gleich (s. Abb. 10).

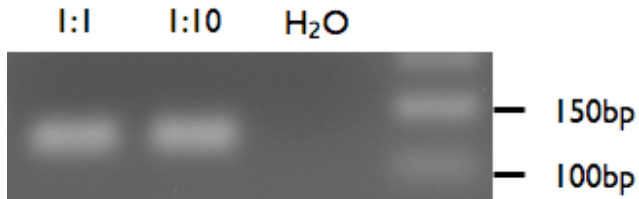


Abb. 10: 2%iges Agarose Gel mit 130bp großem Amplikon.

3.1.2. CCM2

Nach Etablierung der Echtzeit RT-PCR konnte auch die *CCM2* Expression in HUV Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Amplifikationskurve der *CCM2* Echtzeit RT-PCR zeigt einen deutlich früheren Anstieg mit einem Ct Wert von 25,85 der HUV Endothelzell 1:1 Verdünnung im Vergleich zu einem Ct Wert von 28,7 der HUV Endothelzell 1:10 Verdünnung (s. Abb. 11). Die Negativkontrolle zeigt einen minimalen Anstieg, welcher aber den *Threshold* nicht überschreitet.

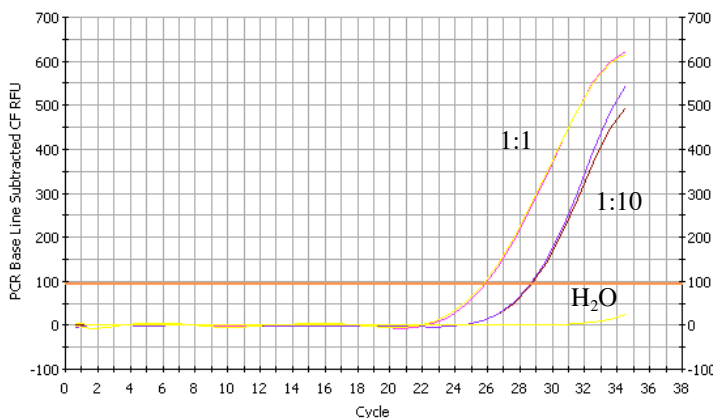


Abb.11: Echtzeit RT-PCR Amplifikationskurve von *CCM2* einer 1:1 Verdünnung aus HUV Endothelzellen, einer 1:10 Verdünnung aus HUV Endothelzellen und einer H₂O Negativkontrolle.

Probe	Ct
HUVEC 1:1 Probe 1	25,9
HUVEC 1:1 Probe 2	25,8
HUVEC 1:10 Probe 1	28,7
HUVEC 1:10 Probe 2	28,7
H ₂ O Probe	Keine Amplifikation

Tab. 5: Ct Werte nach Etablierung der Echtzeit RT-PCR für *CCM2* der in Abb. 12 gezeigten Amplifikationskurve.

Die Schmelzkurve für alle Proben zeigt einen einfachen, für dieses Primerpaar spezifischen Ausschlag bei 87,75°C. Es werden keine unspezifischen Produkte gebildet. Die Negativkontrolle weist keine unspezifische Produktbildung auf (s. Abb. 12).

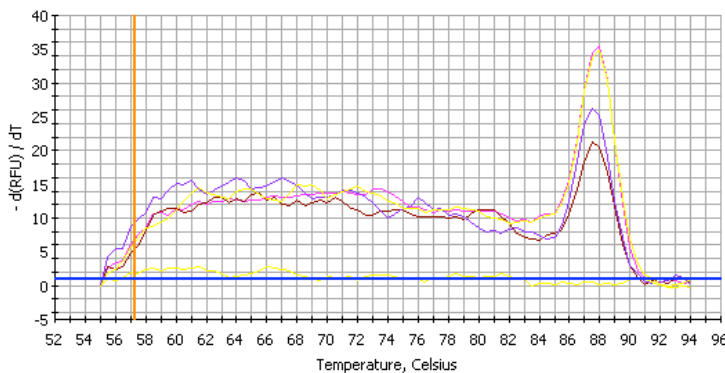


Abb.12: Echtzeit RT-PCR Schmelzkurve von *CCM2* einer 1:1 Verdünnung aus HUV Endothelzellen, einer 1:10 Verdünnung aus HUV Endothelzellen und einer H₂O Negativkontrolle.

Die Produkte wurden zusätzlich auf ein 2% Agarosegel aufgetragen, um die Größe des Produktes und ein weiteres mal die Spezifität zu überprüfen. Wieder spiegelt das Bild die gemachte Aussage durch die Fluoreszenzmessung der Echtzeit RT-PCR wider (s. Abb. 13).

Die 1:1 Verdünnung weist eine etwas stärkere Bande auf als die 1:10 Verdünnung. Die Negativkontrolle weist eine schwache Bande auf, welche ebenfalls mit der Amplifikationskurve korreliert. Aufgrund der Größe wird von einer Primerwolke ausgegangen, welche aufgrund des Verbrauches der Primer in den HUV Endothelzell Verdünnungen nicht auftritt und somit in den Verdünnungen das Ergebnis auch nicht verfälscht.

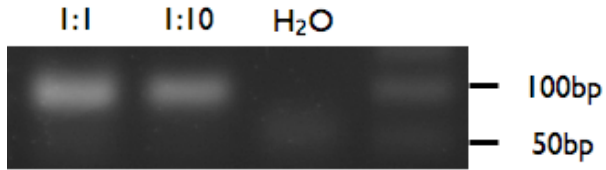


Abb.13: 2%iges Agarose Gel mit 97bp großem Amplikon.

3.1.3. CCM3

Wie in Abbildung 14 gezeigt, konnte auch die Expression von *CCM3* in HUV Endothelzellen nachgewiesen werden. Die 1:1 Verdünnung der HUV Endothelzellen zeigt ein früheres Überschreiten des Schwellenwertes mit einem Ct Wert von 23,9 als die 1:10 Verdünnung mit einem Ct Wert von 26,75. Die Negativkontrolle zeigt keine Amplifikation.

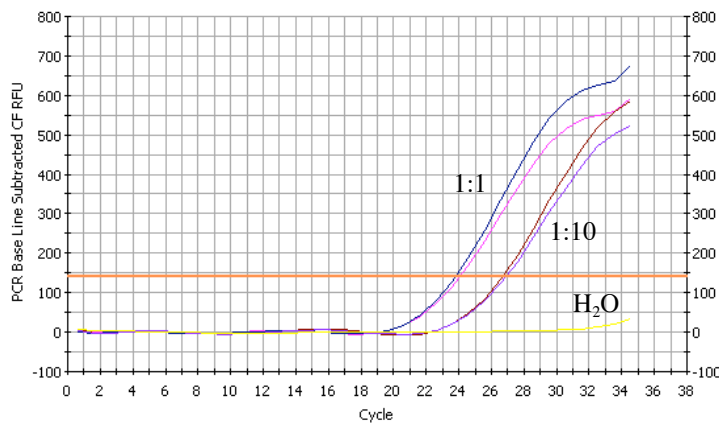


Abb.14: Echtzeit RT-PCR Amplifikationskurve von *CCM3* einer 1:1 Verdünnung aus HUV Endothelzellen, einer 1:10 Verdünnung aus HUV Endothelzellen und einer H₂O Negativkontrolle.

Probe	Ct Wert
HUVEC 1:1 Probe 1	24
HUVEC 1:1 Probe 2	23,8
HUVEC 1:10 Probe 1	26,7
HUVEC 1:10 Probe 2	26,8
H ₂ O Probe	Keine Amplifikation

Tab.6: Ct Werte nach Etablierung der Echtzeit RT-PCR für *CCM3* der in Abb. 15 gezeigten Amplifikationskurve.

Die Schmelzkurve von *CCM3* zeigt einen einzelnen, für dieses Primerpaar spezifischen Ausschlag bei 79,5°C. Es werden keine unspezifischen Produkte gebildet. Die Negativkontrollen zeigen keinen Ausschlag (s. Abb. 15).

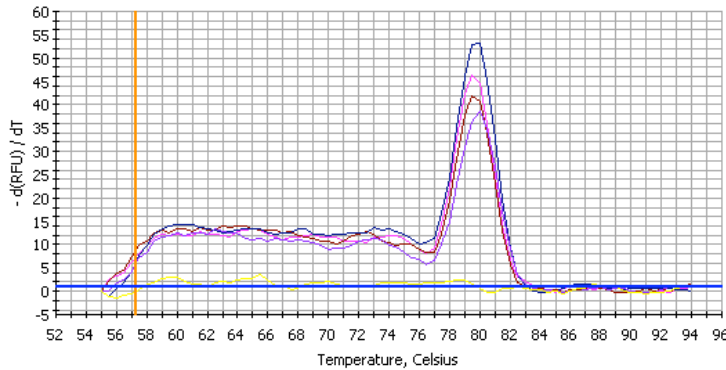


Abb.15: Echtzeit RT-PCR Schmelzkurve von *CCM3* einer 1:1 Verdünnung aus HUV Endothelzellen, einer 1:10 Verdünnung aus HUV Endothelzellen und einer H₂O Negativkontrolle.

Das Agarosegel weist sowohl in der 1:1 als auch in der 1:10 Verdünnung eine einzelne Bande auf. Die Banden sind ähnlich stark abgebildet, welches mit der Echtzeit RT-PCR Amplifikationskurve nach 35 Zyklen übereinstimmt (s. Abb. 16).

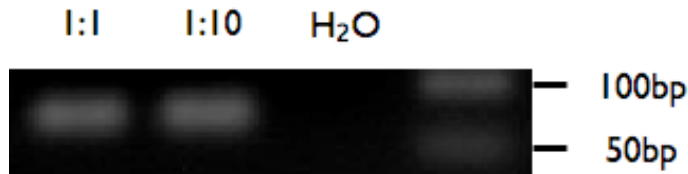


Abb.16: 2%iges Agarose Gel mit 77bp großem Amplikon.

3.2. Transfektion k.d. *CCM1*

Eine effektive Möglichkeit, Genexpressionen in kultivierten Säugerzellen runter zu regulieren, ist die Anwendung von *RNA interference*. Sequenzspezifische doppelsträngige RNA wird in die Zellen eingeführt und degradiert zielgerichtet die spezifische mRNA, wodurch eine Proteinsynthese verhindert oder verringert wird.

Die Etablierung eines Zellkultursystems, in welchem das Gen *CCM1* in HUV Endothelzellen runterreguliert wird, bietet neben der Erforschung der für die Entstehung

des Kavernoms verantwortlichen Signalwege die für uns im Vordergrund stehende Möglichkeit der Erforschung funktioneller Veränderungen der Endothelzellen. In dieser Arbeit wurden nach Etablierung der transienten Runterregulation mit siRNA zunächst nur morphologische und proliferative Veränderungen erfasst.

Die HUV Endothelzellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion mit einer Dichte von 10 000 Zellen pro cm^2 auf Zellkulturschalen ausplattiert. Die Transfektion wurde mit einer siRNA Konzentration von 70nM durchgeführt. Die Ergebnisse waren reproduzierbar.

Die *short interfering RNAs* sind (durch den Anbieter) wie folgt bezeichnet:

siRNA silencer negative control #1 der Firma Ambion, Darmstadt

siRNA CCM1 #15469 der Firma Ambion, Darmstadt

siRNA CCM1 #15655 der Firma Ambion, Darmstadt

3.2.1. Validierung durch Echtzeit RT-PCR

Zum Nachweis der erfolgten Runterregulation durch die siRNA mittels transienter Transfektion wurde eine dreifach Validierung durch Echtzeit RT-PCR durchgeführt. Eine Runterregulation sowohl mit der siRNA CCM1 #15469 als auch mit der siRNA CCM1 #15655 in HUV Endothelzellen konnte nachgewiesen werden.

Zellernten nach 48, 72 und 96 Stunden nach transienter Transfektion ergaben ein Maximum der Runterregulation in den HUV Endothelzellen nach 48 Stunden. Nach 72h war keine Runterregulation mehr festzustellen (s. Abb. 17 u. 18, s. Tab. 7 u. 8).

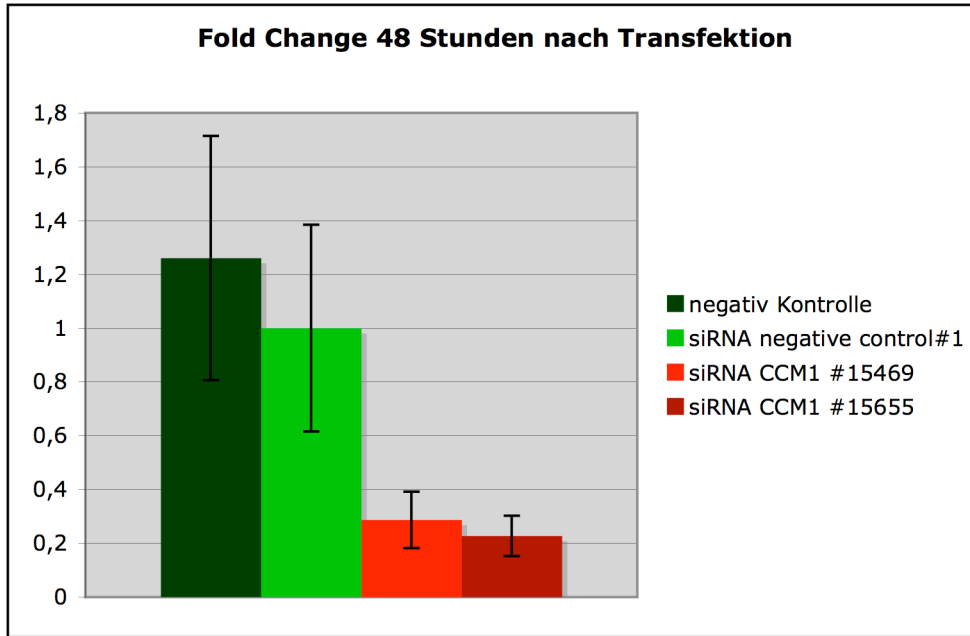


Abb.17: Runterregulation von *CCM1* 48 Stunden nach transienter Transfektion mit siRNA in HUV Endothelzellen

Probe	$\Delta\Delta Ct$	Fold Change	Standardabweichung
Negativkontrolle	0,333333333	1,25992105	0,453785563
siRNA neg control#1	0	1	0,383847527
siRNA CCM1 #15469	-1,8	0,287174589	0,104700773
siRNA CCM1 #15655	-2,13333333	0,227930622	0,075218032

Tab. 7: $\Delta\Delta Ct$, Fold Change und Error/Standardabweichung 48 Stunden nach Runterregulation von *CCM1*.

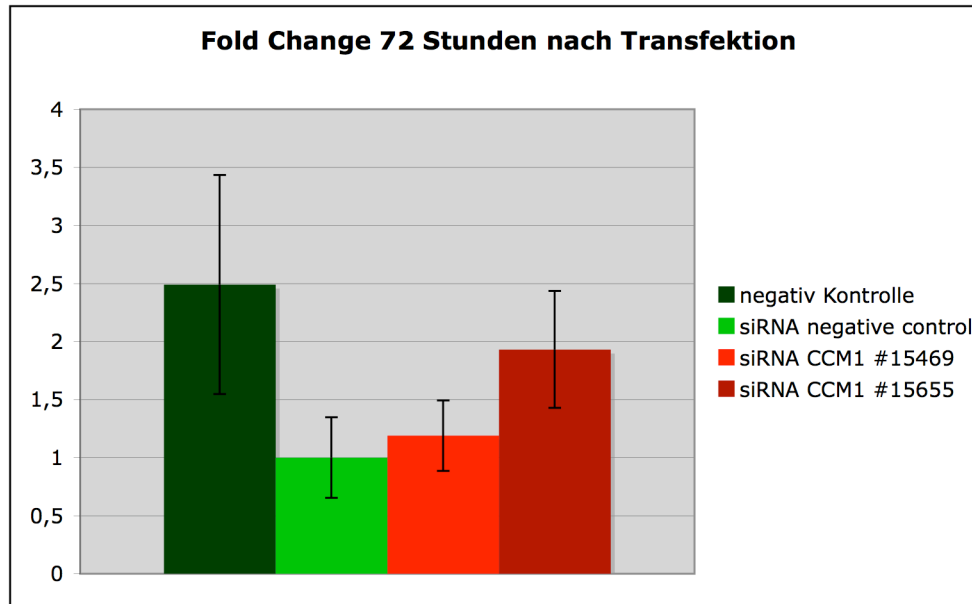


Abb. 18: Runterregulation von *CCM1* 72 Stunden nach transienter Transfektion mit siRNA in HUV Endothelzellen.

Probe	$\Delta\Delta Ct$	Fold Change	Standardabweichung
Negativkontrolle	1,316666667	2,490899245	0,943045207
siRNA neg control #1	0	1	0,34657359
siRNA CCM1 #15469	0,25	1,189207115	0,302865527
siRNA CCM1 #15655	0,95	1,931872658	0,504008423

Tab. 8: $\Delta\Delta Ct$, Fold change und error nach Runterregulation von *CCM1* 72 Stunden nach transienter Transfektion mit siRNA in HUV Endothelzellen.

3.2.2. Morphologische Veränderungen

Nach der Transfektion mit siRNA zeigten sich morphologisch erste Veränderungen nach 48 Stunden mit einem Maximum der Veränderungen nach 72 Stunden. Die hier dargestellten Bilder wurden 72 Stunden nach Transfektion bei gleicher Aussaat fotografiert.

Abbildungen 19 und 20 zeigen die HUV Endothelzellen unbehandelt in der Zellkultur. Es zeigt sich ein Zelldichte von circa 80 bis 90%, die Zellkörper sind überwiegend rundlich bis oval, in Abbildung 20 auch mit annähernd dreieckigen Formen (grüne Pfeile). Es zeigen sich überwiegend keine bis kurze Zellfortsätze, vereinzelt auch mittellange

Zellfortsätze (rote Pfeile). Bei hoher Dichte zeigen sich pflastersteinartige Anordnungen der Endothelzellen (blaue Vierecke).

Abbildungen 21, 22, 23 und 24 zeigen die HUV Endothelzellen transfiziert mit siRNA *Silencer Negativkontrolle #1*. Die Zellen weisen eine vergleichbare Größe zu den nicht behandelten Zellen der Negativkontrolle auf. Die Zelldichte beträgt ebenfalls circa 80 bis 90%. Die Zellkörper zeigen sich überwiegend rundlich bis oval (grüne Pfeile) mit keinen bis kurzen Zellfortsätzen. In Bereichen geringerer Dichte sind diese etwas weiter ausgezogen (rote Pfeile). Die Anordnung ist überwiegend Pflastersteinartig (blaue Vierecken).

Abbildungen 25, 26, 27 und 28 zeigen die HUV Endothelzellen transfiziert mit siRNA CCM1 #15469. Die Zellen sind im Vergleich zu den Negativkontrollen etwas größer. Die Zelldichte beträgt circa 50%. Die Form der Zellkörper ist überwiegend länglich (grüne Pfeile), vereinzelt zeigen sich auch rundliche Zellen, die den Zellen der Negativkontrollen entsprechen (gelbe Pfeile). Die Zellfortsätze scheinen schon aufgrund der Zellform etwas länger als in den Negativkontrollen (rote Pfeile). Es lässt sich keine klare Anordnung zueinander erkennen.

Abbildungen 29, 30, 31 und 32 zeigen die HUV Endothelzellen transfiziert mit siRNA CCM1 #15655. Die Zellen sind deutlich länger. Die Zelldichte beträgt circa 50%. Die Zellkörper sind länglich, sehr schmal und die Zellkörper erscheinen höher (grüne Pfeile), zusätzlich zeigen sich rundliche Zellkörper entsprechen denen der Negativkontrollen (gelbe Pfeile). Es zeigen sich deutlich längere Zellausläufer im Vergleich zu den Negativkontrollen (rote Pfeile). Die länglichen Zellen ordnen sich parallel zueinander an (blaue Vierecken).

Die Zellen mit Runterregulation von *CCM1* zeigen eine nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit ausgewertete geringere Zelldichte. Die Zellen stellen sich im Vergleich zu den Negativkontrollen eher spindelförmig dar. Die Zellfortsätze ordnen sich tendenziell parallel zueinander an. Die Zellkörper erscheinen höher und schmaler. Die *CCM1* runterregulierten Zellen sind tendenziell größer als die Kontrollzellen.

Besonders in der Runterregulation durch die siRNA CCM1 #15655 zeigt sich zusätzlich eine strangförmige Anordnung der spindelförmigen Zellen.

Negativkontrolle

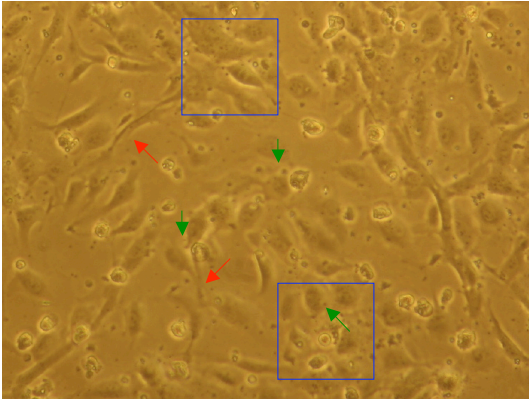


Abb. 19: HUV Endothelzellen, ohne weitere Behandlung.

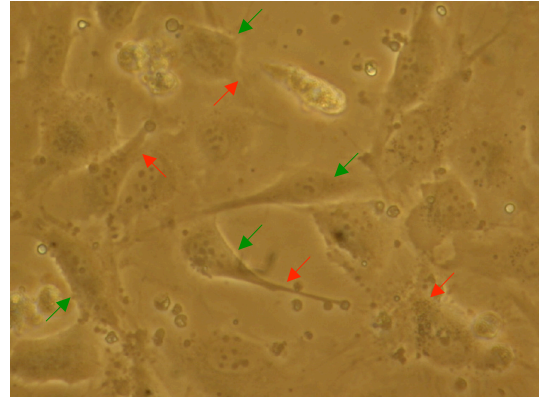


Abb. 20: HUV Endothelzellen, ohne weitere Behandlung .

siRNA negative control #1

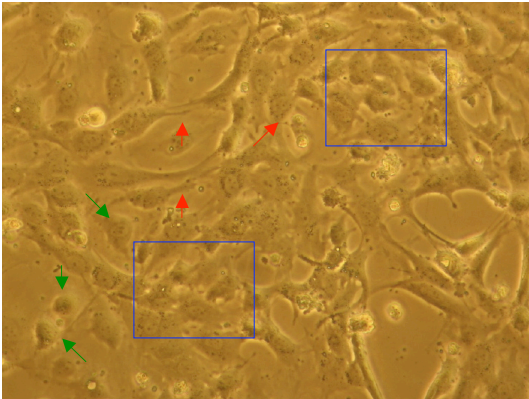


Abb. 21: HUV Endothelzellen, mit der siRNA negative control #1 transfiziert.

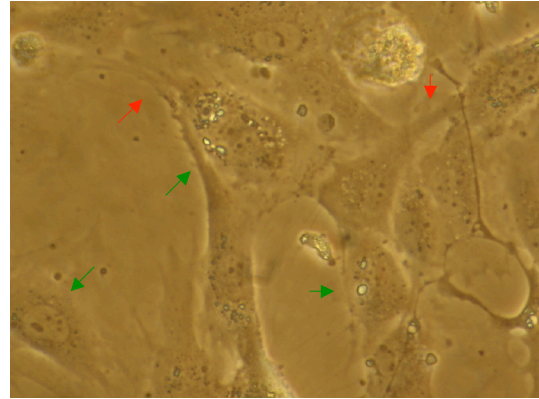


Abb. 22: HUV Endothelzellen, mit der siRNA negative control #1 transfiziert.

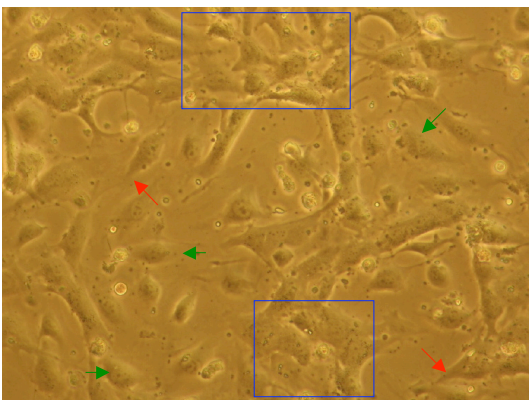


Abb. 23: HUV Endothelzellen, mit der siRNA negative control #1 transfiziert.

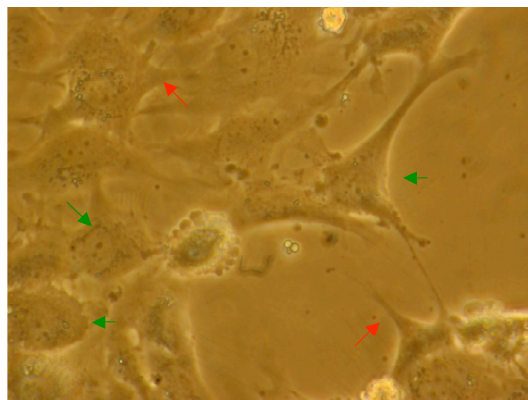


Abb. 24: HUV Endothelzellen, mit der siRNA negative control #1 transfiziert.

siRNA CCM1 #15469

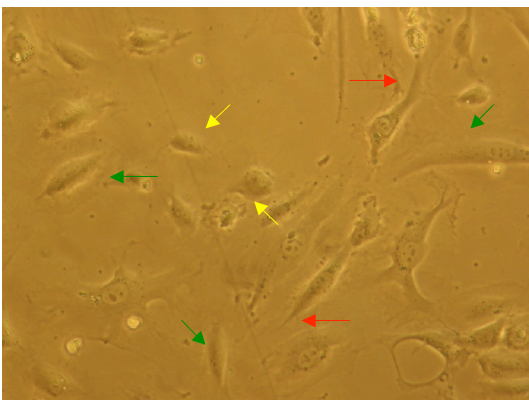


Abb. 25: HUV Endothelzellen, mit der siRNA CCM1 #15469 transfiziert.

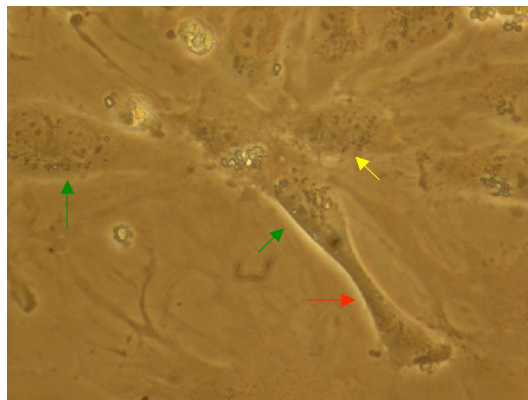


Abb. 26: HUV Endothelzellen, mit der siRNA CCM1 #15469 transfiziert.

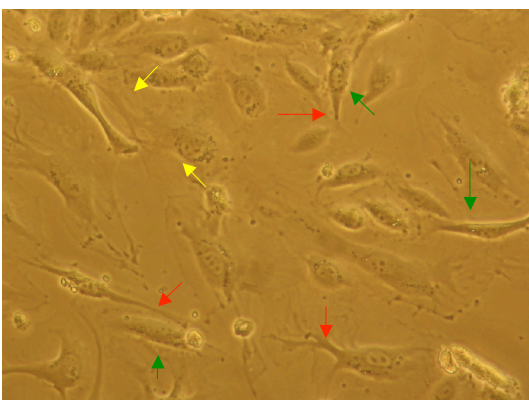


Abb. 27: HUV Endothelzellen, mit der siRNA CCM1 #15469 transfiziert.

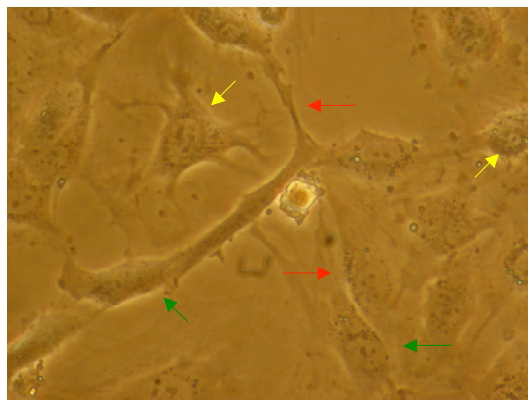


Abb. 28: HUV Endothelzellen, mit der siRNA CCM1 #15469 transfiziert.

siRNA CCM1 #15655

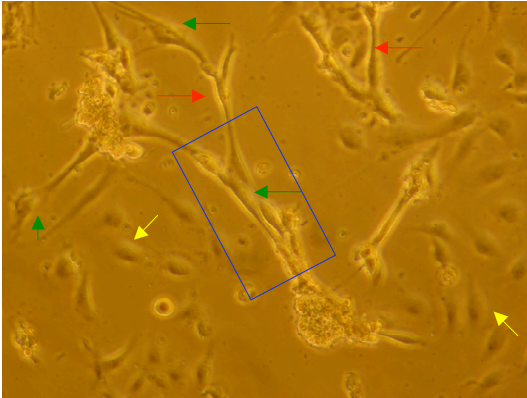


Abb. 29: HUV Endothelzellen, mit der siRNA CCM1 #15655 transfiziert.

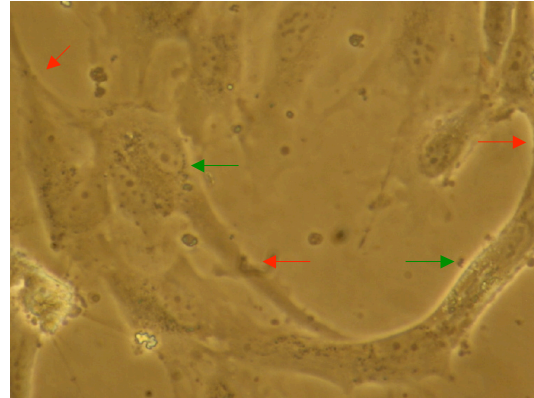


Abb. 30: HUV Endothelzellen, mit siRNA CCM1 #15655 transfiziert.

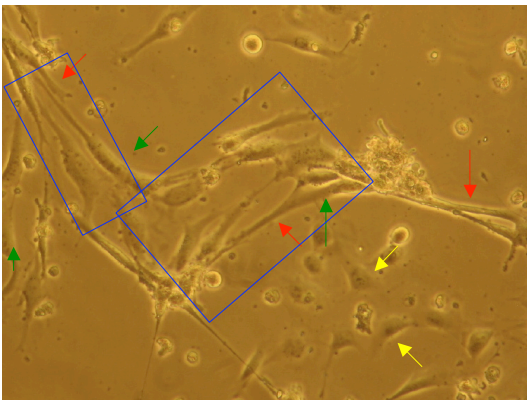


Abb. 31: HUV Endothelzellen, mit der siRNA CCM1 #15655 transfiziert.

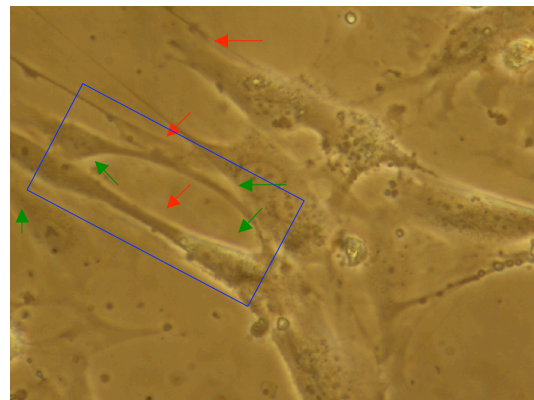


Abb. 32: HUV Endothelzellen, mit der siRNA CCM1 #15655 transfiziert.

3.2.3. Veränderung des Proliferationsverhaltens

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der HUV Endothelzellen nach transienter Transfektion wurde die *Coulter-Count* Technik durchgeführt. Es wurden 4-fach Bestimmungen durchgeführt, diese mit der unter 2.7. beschriebenen Formel berechnet, und aus den Ergebnissen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens zeigte eine deutliche Reduktion der Proliferation 72 Stunden nach Transfektion von siRNA CCM1 #15469 und #15655 im

Vergleich zur negativen siRNA Kontrolle (s. Abb. 33 u. Tab. 9). Dieses Ergebnis konnte in der eigenen Arbeitsgruppe von Dr. Y. Zhu durch Zellzählung reproduziert werden.

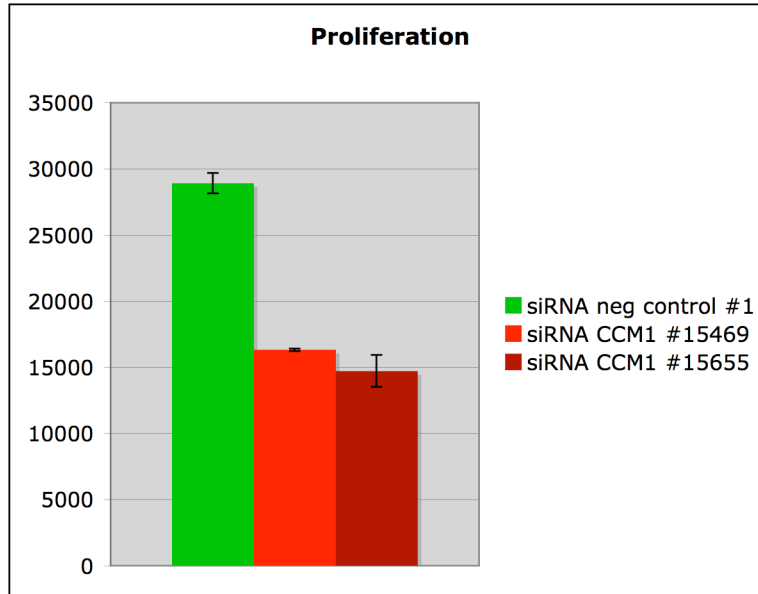


Abb. 33: Vierfach Bestimmung der Proliferation 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA.

Probe	Zellzahl	Prozent	Standardabweichung
siRNA neg control #1	28914,62951	100	772,8169827
siRNA CCM1 #15469	16319,67049	0,564408771	100,6417415
siRNA CCM1 #15655	14720,22077	0,509092491	1206,841078

Tab. 9: Vierfach Bestimmung der Proliferation 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA.

4. Diskussion

4.1. *Diskussion von Material und Methoden*

Kavernome sind vaskuläre Neubildungen im zentralen Nervensystem, welche aus dilatierten, dünnwandigen, sinusoidalen Blutgefäßen bestehen. Diese sind ultrastrukturell von Endothel ausgekleidet und in dichter kollagener Matrix eingebettet. Komponenten der Blut-Hirn Schranke wie die Tight Junctions fehlen gänzlich oder sind nur anormal vorhanden (Wong et al., 2000; Clatterbuck et al., 2001; Tu et al 2005).

Aufgrund dieser Histologie der Kavernome eignen sich HUV Endothelzellen für die Runterregulation der *CCM* Gene. Zudem sind HUV Endothelzellen schon vielfach in der Zellkultur eingesetzt.

Die Kultivierung von humanen Zellen bietet uns die Möglichkeit, in vitro diese Zellen zu beobachten und zu manipulieren. Es gibt uns die Möglichkeit, Systeme zu erstellen, welche einen Teil einer Krankheitssituation nachahmen. Es darf allerdings zu keinem Zeitpunkt außer Acht gelassen werden, dass diese artifizielle Umgebung und die gesamte Behandlung der Zellen nicht gleichzusetzen ist mit der natürlichen Nische und den natürlichen Mechanismen dieser Zelle im Körper. Es ist ein Arbeitsmodell, welches hilft, die komplexen Vorgänge im Körper zu vereinfachen und in Ansätzen zu verstehen.

4.1.1. **RNA interference**

Auf das Phänomen der *RNA interference* ist man bei dem Versuch der Runterregulation von Genen in der Nematode *C. elegans* gestoßen, wobei sich bei simultaner Einführung von sense und antisense RNA eines bestimmten Gens eine potente und sehr spezifische Runterregulation zeigte. *RNA interference* ist ein hoch konservierter zellulärer Abwehrmechanismus, welcher auch in Säugerzellen zu beobachten ist (Fire et al., 1998). Ausgelöst wird dieser Mechanismus von 21 bis 25 bp langen RNA Doppelsträngen, welche zur Degradierung der einzelsträngigen mRNA durch eine spezifische RNA Endonuklease, bekannt als der *RNA induced silencing complex* (RISC), führt. Dieser

degradiert die mRNA katalytisch sehr effektiv bis zu nicht mehr nachweisbaren Mengen, womit eine Proteinsynthese nicht mehr möglich ist (Strachan et al., 2004).

Experimente mit *short interfering RNA* sind eine vielversprechende und auch bewährte Methode zur Analyse des Funktionsverlustes bestimmter Gene. Trotz der Erfolge dieser Methode in den letzten Jahren sollte diese doch kritisch in Betracht gezogen werden.

Das Design einer siRNA zur Runterregulation eines bestimmten Gens ist nicht trivial. Es gibt bestimmte Kriterien, die eine effektive Runterregulation einer siRNA wahrscheinlicher machen, die aber ihre Limitierungen hat. Viele der siRNAs sind nicht funktionell, und es ist bekannt, dass auch „off-target“ Genregulationen durch siRNAs sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene möglich sind (Mittal, 2004; Jackson et al., 2004). Die in dieser Arbeit benutzten siRNAs sind designed, validiert und hergestellt von der Firma Ambion, Darmstadt. Es wird davon ausgegangen, dass diese siRNAs effizient sind und keine off-target Effekte aufweisen.

Transfektion bezeichnet den nichtviral übertragenen Gentransfer. GeneSilencer™ siRNA Transfection Reagent ist ein auf kationischen Lipiden basierendes Reagenz, welches zu einer Liposomen-vermittelten Transfektion führt (Strachan et al., 2004).

Die Transfektionsansätze mit lipophilen Agenzien in Säugerzellen haben ihre Limitationen in der Transienz der Expression und in manchen Fällen auch in der Lipid übermittelten Toxizität (Mittal, 2004). Im Vergleich dazu ist die Methode, in der ein Plasmid eine siRNA-Expressions Kasette enthält, von Vorteil, da diese Methode die oben genannten Limitationen nicht beinhaltet. Sie sichert eine stabile Expression von short hairpin RNAs und ist somit eine sehr brauchbare Methode zur Analyse von „loss-of-function“ Phänotypen, welche sich über einen längeren Zeitraum entwickeln (Mittal et al., 2004). Allerdings benötigt diese Methode ein grösseres „Know-How“, eine höhere Sicherheit im Labor und einen deutlichen Mehraufwand in der Versuchsdurchführung. Aufgrund der Einschränkungen in den räumlichen Gegebenheiten wurde eine Runterregulation durch lipophile Agenzien vorgezogen.

Neben der Herstellung des Transfektionsansatzes ist das Ausplattieren der Zellen für die Transfektion von besonderer Bedeutung. Es kann die Effizienz dieser deutlich beeinträchtigen. Ein zu dichtes oder zu gering dichtes Ausplattieren verringert die

Effizienz der Transfektion. Auch ein ungleichmäßiges Ausplattieren führt somit aufgrund der unterschiedlichen Dichte zu Effizienzproblemen bei der Transfektion.

4.1.2. Echtzeit RT-PCR

Die Expression der *CCM* Gene und die Validierung der Runterregulation von *CCM1* wurde mittels Echtzeit RT-PCR nachgewiesen. Die Echtzeit RT-PCR ist eine Form der quantitativen PCR, bei welcher eine Fluoreszenz detektierende Thermocycler Maschine simultan zur Amplifikation der spezifischen Nukleinsäure Sequenzen die Konzentration misst. Die zwei großen Anwendungsgebiete der Echtzeit RT-PCR sind zum einen, wie in dieser Arbeit angewendet, die Quantifizierung bestimmter Genexpressionen und zum anderen das Screening nach Mutationen und einzelnen Nucleotid-Polymorphismen (Strachan et al., 2004).

Bei der in dieser Arbeit angewendeten relativen Quantifizierung, wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes „Housekeeping Gen“ bezogen. Dieser Vorgang wird auch Normalisierung der Expressionsergebnisse genannt. (Rasmussen R. 2001). Diese Methode der relativen Quantifizierung setzt voraus, dass das Housekeeping Gen in keinem Fall von der Runterregulation des zu untersuchenden Gens beeinflusst wird. In dieser Arbeit wurde GAPDH als „Housekeeping Gen“ benutzt, welches laut Literatur in keiner Weise von den *CCM* Genen beeinflusst wird.

Voraussetzung für einen zuverlässigen quantitativen Nachweis in der Echtzeit RT-PCR ist eine funktionierende mRNA Analytik, welche exakte mRNA Quantifizierungsergebnisse bei ausreichender Genauigkeit und hoher Wiederholbarkeit liefert (Pfaffl 2004). Bei einer Effizienz der PCR von 100% verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer Ct entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA, respektive mRNA Startmenge (Pfaffl 2004). Daraus ergibt sich die Signifikanz der richtigen mRNA Quantifizierung und der mRNA Reinheit.

Die in der Echtzeit RT-PCR benutzten Primer stellen immer einen kritischen Punkt dar. Zum einen muss das Design der Primer nach bestimmten Kriterien ausgeführt werden,

um ein spezifisches Produkt und eine effiziente PCR zu bekommen, zum anderen müssen die unterschiedlichen Transkripte des Gens beachtet werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Universal Probe Library der Firma Roche nach aktuellen Kriterien entworfen. Um zu gewährleisten, dass alle Transkripte des jeweiligen Gens mit dem jeweiligen Primerpaar erfasst werden, wurden die Primersequenzen in jeder Transkriptsequenz des Gens aufgesucht. Um unspezifische oder falsche Genprodukte zu verhindern, wurden die Primer in Human BLAT Search überprüft.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Expression der CCM Gene in HUV Endothelzellen

In dieser Arbeit wurde die mRNA Expression von *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* über den Nachweis der cDNA in der Echtzeit RT-PCR gezeigt. Aufgrund mangelnder klinischer Bedeutung wurde auf eine relative Quantifizierung verzichtet, es wurde ausschließlich ein qualitativer Nachweis durchgeführt.

In den Ergebnissen sind jeweils die Amplifikationskurven, die Schmelzkurven, die Tabellen mit den Ct Werten und die Gelbilder der elektrophoretisch aufgetrennten Produkte der Echtzeit RT-PCR dargestellt. Die Amplifikationskurve zeigt die simultan zur Vervielfältigung der Ausgangsmenge cDNA, welche der Ausgangsmenge mRNA des Gens entspricht, gemessene Fluoreszenz. Der Schwellenwert wurde vom Programm automatisch festgelegt, der Ct Wert ist dargestellt an dem Punkt, an welchem die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet. Die Kurven erreichen nach 30 bis 35 Zyklen ein Plateau, welches durch den Verbrauch der für die Produktsynthese benötigten Reagenzien erklärt wird. Die Tabelle mit den Ct Werten gibt die Schnittpunkte von Kurven und Schwellenwert in Zahlenwerten wieder. Desweiteren wurden die Schmelzkurven gezeigt, welche, wie auch die Gelbilder, die Spezifität der Echtzeit RT-PCR zeigen. Die Schmelzkurven zeigen jeweils nur einen für das jeweilige Primerpaar spezifischen Ausschlag. Das Gelbild zeigt zum einen die Größe des jeweiligen Produktes und ebenfalls durch das Vorhandensein von jeweils nur einer Bande, die Spezifität.

Die Echtzeit RT-PCR des Gens *CCM1* konnte etabliert werden, und die Expression von *CCM1* konnte mittels Echtzeit RT-PCR nachgewiesen werden. Die Schmelzkurve der etablierten Echtzeit RT-PCR für *CCM1* zeigt Ct Werte der 1:1 Verdünnung von 21,3 bzw. 21,4 und Ct Werte der 1:10 Verdünnung der Probe von 24,4 bzw. 24,3.

Nach über 30 Zyklen gleichen sich die Produktmengen wieder aneinander an, da die hinzugegebenen Reagenzien limitierend für die Produktmenge sind. Dies erklärt die in etwa gleich starken Banden im Agarosegel. Die Schmelzkurve dieser Echtzeit RT-PCR zeigt keine Bildung unspezifischer Produkte.

Die Echtzeit RT-PCR des Gens *CCM2* konnte ebenfalls etabliert werden, und die Expression von *CCM2* konnte mittels Echtzeit RT-PCR nachgewiesen werden. Die Schmelzkurve der etablierten Echtzeit RT-PCR für *CCM2* zeigt Ct Werte der 1:1 Verdünnung von 25,8 bzw. 25,9 und Ct Werte der 1:10 Verdünnung der Probe von 28,7.

Auch hier spiegelt das Bild der Amplifikationskurve das Bild des Agarosegels wieder. Die Produktmenge der Verdünnungen erreicht nach etwa 35 Zyklen noch nicht das Plateau der gleichen Produkt-End-Menge. Dementsprechend ist ein Unterschied in der Bandenstärke zwischen der 1:1 Verdünnung und der 1:10 Verdünnung ersichtlich. Die Negativkontrolle weist eine minimale Bande im Bereich von 40 bis 50 bp auf. Diese entspricht aufgrund der Größe des Produktes der Primerwolke (siehe auch 3.1.2. *CCM2*). Die Schmelzkurve dieser Echtzeit RT-PCR zeigt keine Bildung unspezifischer Produkte.

Auch die Echtzeit RT-PCR des Gens *CCM3* konnte etabliert werden, und die Expression von *CCM3* konnte nachgewiesen werden. Die Amplifikationskurve der etablierten Echtzeit RT-PCR für *CCM3* zeigt Ct Werte der 1:1 Verdünnung von 24,0 bzw. 23,8 und Ct Werte für die 1:10 Verdünnung der Probe von 26,7 bzw. 26,8.

Nach über 33 Zyklen gleichen sich die Produktmengen wieder aneinander an. Auch hier zeigten sich, wie erwartet, etwa gleich starke Banden der Verdünnungen im Agarosegel. Die Negativkontrolle weist keine Amplifikation auf. Die Schmelzkurve dieser Echtzeit RT-PCR zeigt keine Bildung unspezifischer Produkte.

4.2.2. Bedeutung der Expression von *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* in Endothelzellen

Der Funktionsverlust von *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* im Kavernom steht vermutlich im Zusammenhang mit den nur anormal vorhandenen oder gänzlich fehlenden Tight Junctions des Endothels, welches die Sinusoide der Kavernome auskleidet (Wong et al., 2000; Clatterbuck et al., 2001; Tu et al., 2005). Wäre eine Expression dieser drei Gene in Endothelzellen nicht nachweisbar, wären die Endothelzellen als Zellart, welche das Kavernom mitverursacht, ausgeschlossen. Da die Expression aller drei Gene jedoch in Endothelzellen nachgewiesen werden konnte, unterstützt dies die Vermutung, dass die *CCM* Mutationen in den Endothelzellen und nicht in anderen Zellen, wie z.B. Astrozyten, die zentrale Rolle in der Entstehung des Kavernoms spielen.

4.2.3. Verminderung der Expression von *CCM1*

Neben der klinischen Bedeutung der Expression von *CCM1* in HUV Endothelzellen, spielt auch die Funktion im Rahmen der Erstellung unseres Zellkultursystems eine bedeutende Rolle. Hierbei wurden die Veränderungen durch die Verringerung der Expression von *CCM1* untersucht. Diese Runterregulation wurde mittels Echtzeit RT-PCR validiert und es wurden das proliferative Verhalten und die morphologischen Veränderungen erfasst.

Es konnte eine Reduktion der Expression der mRNA 48 Stunden nach Transfektion auf 29% mit der siRNA *CCM1* #15469 und auf 23% mit der siRNA *CCM1* #15655 erreicht werden. Die Standardabweichungen werden mit Messungenauigkeiten und Pipettierfehlern erklärt.

Es zeigte sich, dass die Expression von *CCM1* 72h nach Transfektion im Verhältniss zur Kontroll siRNA ansteigt. Dieser Effekt lässt sich mit einer überschießenden Proliferation aufgrund der Zelldichte auf der Schale erklären. Die Proliferation ist in den *CCM1* runterregulierten Zellen verringert. Dementsprechend ist die Zelldichte geringer im Vergleich zu der Zelldichte auf den Kontrollplatten. Aufgrund von gegenseitiger Inhibition auf der dichteren Platte proliferiert die einzelne Zelle auf der Platte mit

geringerer Dichte schneller und somit ist auch die Expression aller an Proliferation beteiligter Gene, dementsprechen auch *CCMI* erhöht.

4.2.4. Morphologie

Das Endothel ist die zum Gefäßlumen hin gerichtete, innerste Wandschicht von Lymph- und Blutgefäßen, die Intima. Die Endothelzellen vermitteln die Interaktionen zwischen Blut bzw. Lymphe und Gewebe.

Endothelzellen werden als flache Zellen mit einer Dicke von circa 1 bis $2\mu\text{m}$ und einem Durchmesser von circa $10\text{-}20\mu\text{m}$ beschrieben. Der Nukleus ist in der Regel zentral gelegen. Es zeigt sich ein pflastersteinartiges Relif, in welchem die Zellränder sich überlappen und dadurch einen Verschluss der Blutgefäße erreichen. Das Zytoplasma beinhaltet verhältnismäßig wenige Zellorganellen, welche hauptsächlich in der perinuklearen Zone lokalisiert sind (McGeachie, Internetseite). Dieses Pflastersteinrelif konfluenter Endothelzellen wurde in diversen Endothel-Zelllinien, unabhängig von dem primären Isolations-Organ festgestellt (Unger et al. 2002, Dermietzel, Internetseite).

Um eine grobe morphologische Untersuchung mit den transfizierten HUV Endothelzellen durchzuführen, wurden die *CCMI* runterregulierten Zellen 72 Stunden nach Transfektion mikroskopisch beurteilt und photographiert.

Es zeigte sich, dass die *CCMI* runterregulierten Zellen sich im Vergleich zu den Kontrollzellen eher spindelförmig und größer darstellten. Außerdem erschienen die Zellkörper höher und schmaler und bilden im Zellverband strangförmige Strukturen. Diese Beobachtungen korrelieren zum Teil mit den morphologischen Beobachtungen, die eine Gruppe in der Arbeit mit eigens isolierten Kavernomzellen gemacht hat. Es wurden 25 Kavernom-Endothelzelllinien erfolgreich, mit einer Reinheit von über 95%, isoliert. Morphologisch zeigten sich die Zellen ebenfalls größer als die isolierten Endothel-Kontrollzellen. Die Zellen konnten in zwei Untergruppen eingeteilt werden, wobei sich die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen in HUV Endothelzellen nach Runterregulation von *CCMI* mit denen der ersten Gruppe der Kavernomzellen decken.

Etwa 60% dieser Zelllinien waren größer und spindelförmig, während die restlichen 40% der Zelllinien eher eine runde Form aufwiesen (Zhao et al., 2007).

In diesem Vergleich der Resultate lassen sich Ähnlichkeiten feststellen, allerdings sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Versuche der vorliegenden Arbeit mit HUV Endothelzellen gemacht wurden und lediglich eine Runterregulation von *CCM1* aufweisen, während diese mit den isolierten Endothelzellen aus Kavernomen verglichen werden, welche vermutlich mehr als eine Mutation in einem der *CCM* Gene haben. Der Vergleich der Resultate der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von der Gruppe Zhao et al., 2007 ist insofern eingeschränkt, als zum einen beobachtet wird, welche phänotypischen Veränderungen eine Zelle durchläuft, in welchen *CCM1* runterreguliert ist und zum anderen der Phänotyp von Kavernomzellen beobachtet wird. Dennoch fallen die Ähnlichkeiten auf.

Desweiteren wurden von der Gruppe um Zhao in vitro Angiogenese-Assays durchgeführt, in welchen die isolierten Endothelzellen kultiviert auf Kollagen-Beschichtung mit einer zweiten Lage Kollagen abgedeckt wurden und sich schon nach 24 Stunden Netzwerke mit Lumen bildeten. Eine Behandlung mit VEGF verstärkte dieses Phänomen (Zhao et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Angiogenese-Assays durchgeführt, allerdings bildeten sich nach Runterregulation von *CCM1* in HUV Endothelzellen deutlich mehr strangförmige Strukturen, welche ebenfalls an die Bilder des Angiogenese Assays der Gruppe Zhao et al., 2007 erinnern.

Ungeklärt ist der Unterschied der Morphologie zwischen den HUV Endothelzellen, in welchen *CCM1* zum einen mit der siRNA CCM1 #15469 und zum anderen mit der siRNA CCM1 #15655 runterreguliert wurde. Wie die Abbildungen 25 bis 32 (siehe 3.2.2. Morphologische Veränderungen) zeigen, war die Ausbildung der strangförmigen Strukturen in Zellen runterreguliert mit der siRNA CCM1 #15655 (Abb. 29 bis 32) stärker als mit der siRNA CCM1 #15469 (Abb. 25 bis 28). Auch wirkten die Zellen runterreguliert mit der siRNA CCM1 #15469 (Abb. 25 bis 28) etwas größer und nicht so lang wie die Zellen runterreguliert mit der siRNA CCM1 #15655 (Abb. 29 bis 32).

Erwartet wurde, dass die Runterregulation von *CCM1* mit den verschiedenen siRNAs den gleichen Phänotyp produzieren würde, zumal die siRNAs vom Anbieter Ambion,

Darmstadt validiert wurden. Vermutlich gründen sich diese Unterschiede auf eine bessere Effektivität der Runterregulation der siRNA CCM1 #15655 im Vergleich zur siRNA CCM1 #15469. Auch diese Veränderungen konnten mehrfach reproduziert werden.

4.2.5. Proliferation

Die Veränderung des proliferativen Verhaltens der HUV Endothelzellen wurde nur einmalig nachgewiesen. Sie konnten aber innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe durch Dr. Y. Zhu mehrfach reproduziert werden. Es zeigte sich im Vergleich zur neg siRNA #1 eine Reduktion der Zellzahl nach Transfektion mit siRNA CCM1 #15469 um ca. 44% und der siRNA CCM1 #15655 um ca. 49%.

Wie schon in der Einleitung beschrieben, interagieren KRIT1 und ICAP1 α im β_1 Integrin Signalweg, welcher Zelladhäsion, Zellmigration und Zellproliferation vermittelt (Bouvard et al., 2006). ICAP1 α kann KRIT1 im Zellkern sequestrieren, ist aber die „nuclear localization sequenze“ von ICAP1 α deletiert, verhindert diese Deletion die Lokalisation von ICAP1 α im Zellkern und führt zu einer reduzierten Zellproliferation. (Zawistowski et al., 2005; Fournier et al., 2005). Der zugrunde liegende Mechanismus ist vermutlich eine c-Myc Promotor Stimulation (Fournier et al., 2005).

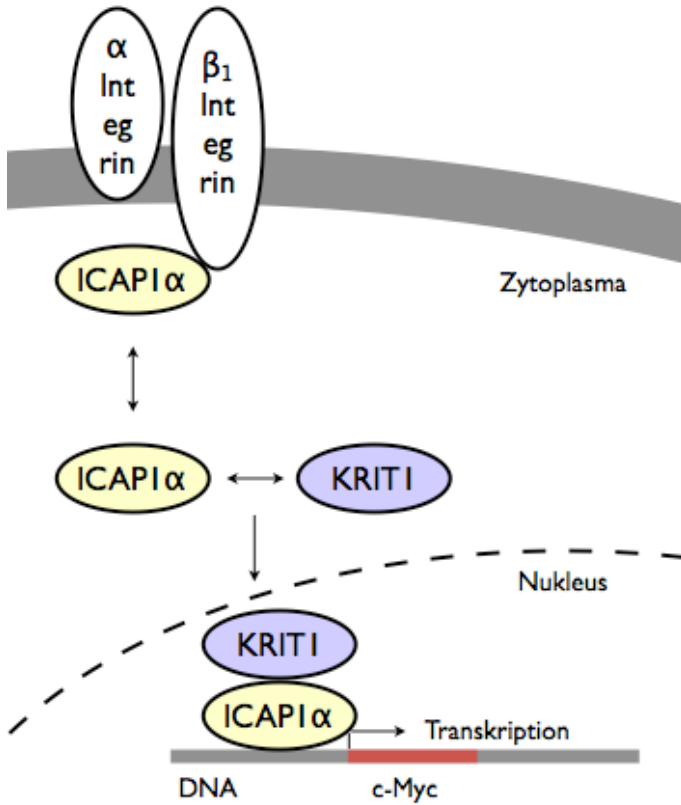


Abb. 34: ICAP1 α bewegt sich im Komplex mit KRIT1 in den Nukleus und aktiviert dort den Promoter von c-Myc. Dies führt zur Transkription von c-Myc und in der Folge zu Veränderungen der Zelladhäsion, Zellmigration und Zellproliferation.

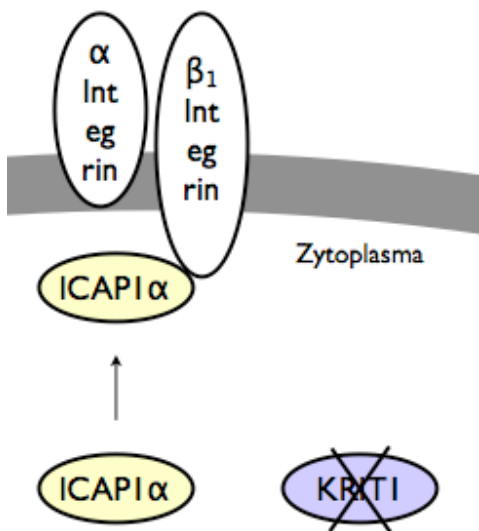


Abb. 35: Durch die Reduktion der Expression von *CCMI* verringert sich die Expression von KRIT1. Entsprechend der Konkurrenz von KRIT1 und β_1 Integrin um den Bindungspartner ICAP1 α ergibt sich bei Reduktion von KRIT1 eine vermehrte Bindung von ICAP1 α mit β_1 Integrin und ein Fehlen des Komplexes von ICAP1 α und KRIT1, welcher im Nukleus die Transkription über den c-Myc Promoter aktiviert.

Eine Reduktion der *CCM1* Expression (KRIT1) scheint zu dem gegenteiligen Endergebnis zu führen. β_1 Integrin konkurriert mit KRIT1 um die Bindung mit ICAP1 α (Zhang et al., 2001). Bei verminderter Expression von KRIT1 bindet ICAP1 α vermehrt an β_1 Integrin, eine Lokalisation von ICAP1 α im Zellkern ist aber nur im Komplex mit KRIT1 möglich. Dies führt zu einer verringerten Transkription von c-Myc und somit u.a. zu einer verringerten Stimulation der Zellproliferation im Zellkern.

Diese von Fournier in vitro beobachtete Mechanismus erklärt die verringerte Proliferation der HUV Endothelzellen unter Runterregulation von *CCM1* durch siRNA, da in diesen Zellen die KRIT1 Expression verringert ist (Abb. 34 und 35).

Die eigene Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Sure konnte in Publikationen die Hypothese unterstützen, dass das Kavernom eine dynamische und nicht wie früher angenommen eine kongenitale Erkrankung ist, welche aus der Embryogenese hervorgeht. Unter anderem wurde in diesen Arbeiten die proliferative Aktivität des Endothels aus Kavernom-Resektaten immunhistochemisch mit Hilfe der Proliferationsmarker PCNA und MIB-1 (Antikörper gegen Ki-67) erfasst. Es zeigten sich in einer Studie von 2001 an 13 Kavernomen erwachsener Patienten 80% der Resektate PCNA und 12% der Resektate MIB1 positiv (Sure et al., 2001). Der gleiche Versuchsaufbau 2005 mit 56 erwachsenen Patienten zeigte 86% der Resektate PCNA positiv und 38% der Resektate MIB1 positiv. Der Unterschied der MIB1 Expression wird durch die kürzere Halbwertszeit von Ki67 erklärt (Sure et al., 2005). Eine Untersuchung 28 pädiatrischer Kavernom-Resektate zeigte 89,3% PCNA positive Resektate und 64,3% positive MIB1 Resektate (Tirakotai et al., 2006). Diese Ergebnisse belegen die Dynamik des Kavernoms in Form von proliferativer Aktivität.

In dieser Arbeit zeigte sich hingegen eine erniedrigte Proliferation in HUV Endothelzellen unter Runterregulation von *CCM1* in vitro.

Diese Beobachtungen sind gegensätzlich, widersprechen sich jedoch nicht. Es werden in vivo Versuche mit einem in vitro Versuch verglichen und somit unterschiedliche Nischen betrachtet. Desweiteren werden völlig unterschiedliche Beobachtungsansätze getätigt. Zum einen stellt das Kavernom den Ausgangspunkt dar, zum anderen eine HUV Endothelzelle.

Die Kavernom-Resektate stammen überwiegend von Patienten mit symptomatischen, nicht familiär auftretenden Kavernomen. Sie wurden nicht auf Alterationen von *CCM1* untersucht. Vermutlich weisen diese Kavernom-Resektate einige andere genetische Alterationen auf, denn die Entstehung sporadischer Kavernome gründet sich nur in wenigen Fällen auf eine Alteration in *CCM1*. Proliferative Veränderungen in den untersuchten Kavernom-Resektaten gründen sich somit auf diese angesprochenen genetischen Alterationen unabhängig von *CCM1*.

5. Zusammenfassung

Kavernome sind vaskuläre Neubildungen im zentralen Nervensystem, welche aus dilatierten, dünnwandigen, sinusoidalen Blutgefäßen bestehen. Histologisch zeigen sich nur anormal vorhandene oder gänzlich fehlende Tight Junctions der Endothelzellen und teilweise fehlende astrozytische Fortsätze, was zu einer Vergrößerung der Zwischenräume der Zellen führt. Klinisch weisen die Patienten zerebrale Blutungen, Krampfleiden oder fokale neurologische Defizite auf. Die Prävalenz des Kavernoms beträgt 0,5%, von diesen weisen jedoch nur 20 bis 30% klinische Symptome auf. Das Kavernom tritt sowohl sporadisch als auch autosomal dominant vererbt auf. Die familiären Fälle stehen im Zusammenhang mit drei Genen und deren, zu einem Funktionsverlust führenden, Mutationen. Mutationen in *CCM1* sind für 40 bis 50% der familiären Fälle verantwortlich, in *CCM2* für 10 bis 20% und in *CCM3* für etwa 40%. Das Modell der Entstehung des Kavernoms gründet sich auf dem von Knudson erstellten two-hit Mechanismus und wird von murinen Forschungsergebnissen mit *Ccm1*^{+/-} *Trp53*^{-/-} doppelt mutierten Mäusen unterstützt. Sowohl CCM1 (KRIT1) als auch CCM2 (Malcavernin) sind in den β_1 Integrin Signalweg eingebunden, welcher unter anderem Zelladhäsion, Zellmigration und Zellproliferation reguliert. Außerdem sind beide Gene an der Aktivierung der p38MAPK beteiligt, von welcher murine Forschungsergebnisse zeigen konnten, dass Mäuse ohne p38 α Mapk signifikante Defekte in der plazentalen Angiogenese und in der Entwicklung der Blutgefäße, besonders im Bereich des Kopfes, aufwiesen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass CCM3 (PDCD10) mit dem ERK Signalweg, welcher ebenfalls Einfluss auf Zellproliferation und Transformation hat, interagiert.

Ziel der Arbeit war es, die Expression der *CCM* Gene nachzuweisen und dadurch die Theorie, dass Endothelzellen in der Pathogenese des Kavernoms eine Hauptrolle spielen, zu unterstützen. Außerdem sollte ein Zellkultursystem erstellt werden, welches uns die Möglichkeit gibt, funktionelle Veränderungen der Endothelzellen nach Runterregulation von *CCM1* festzustellen.

Mittels Echtzeit RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass HUV Endothelzellen alle drei *CCM* Gene exprimieren. Außerdem war es möglich, ein Zellkultursystem in HUV Endothelzellen zu etablieren, in welchem *CCM1* erfolgreich runterreguliert werden konnte. Validiert wurde dieses System ebenfalls mittels Echtzeit RT-PCR. Nachfolgend wurden Veränderungen der Morphologie und der Proliferation erfasst. Morphologisch zeigten sich die Zellen nach Transfektion größer und spindelförmiger als die Kontrollen, und sie bildeten vermehrt strangförmige Strukturen. Diese Beobachtungen ähnelten Zellen isoliert aus Kavernomen in Angiogenese-Assays. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Vermutung, dass der Verlust der Funktion von *CCM1* in Endothelzellen die Hauptrolle in der zum Kavernom führenden Veränderung spielt. Im Proliferationsassay ließ sich eine Verringerung der Proliferationsrate feststellen, welche zeigt, dass ein Funktionsverlust von *CCM1* einen direkten Einfluss auf die Zellproliferation hat.

6. Abstract

Cerebral cavernous malformations are vascular neoplasms in the central nervous system. They consist of dilated, thinwalled, sinusoidal bloodvessels. Histologically the tight junctions of these endothelial cells forming the cerebral cavernous malformation are abnormal or totally missing, also the appendages of the astrocytes can be partly missing, which results wider gaps between the cells.

Main Symptoms are cerebral bleeding, convulsion or focal neurological deficiencies.

The prevalence of cerebral cavernous malformation averages at about 0,5%, of these only 20 to 30% present with clinical symptoms. Cerebral cavernous malformations can occur sporadic or can be autosomal dominant inherited. The familial cases are associated with loss of function mutations within three genes. Mutations of *CCM1* are responsible for 40 to 50%, of *CCM2* for 10 to 20% and mutations of *CCM3* for about 40% of the familial cases.

The model of genesis of the cerebral cavernous malformation builds on the two-hit mechanisms established by Knudson, and is supported by *Ccm1^{+/-} Trp53^{-/-}* mice. *CCM1* (KRIT1) as well as *CCM2* (Malcavernin) are integrated in β_1 integrine signaling, which among other factors regulates adhesion, migration and proliferation of cells. Also both genes are involved in activation of p38MAPK. *P38Mapk^{-/-}* mice have significant defects in plazental angiogenesis and development of bloodvessels, especially in brain vessels. Moreover *CCM3* (PDCD10) interacts with ERK signaling, which also affects proliferation and transformation of cells.

Aim of the present work was to detect the expression of all three *CCM* genes and to test the hypothesis that endothelial cells play a major role in the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. Moreover we wanted to created a tissue culture system, to detect functional changes in endothelial cells after downregulation of *CCM1*.

Using real-time RT-PCR we found the expression of all three *CCM* genes in HUV endothelial cells. A tissue culture system was established also in HUV endothelial cells, where we were able to downregulate *CCM1* by transient transfection with *short interfering RNA*.

Morphologically knock down cells were bigger and more fusiform compared to the control cells. The cells also formed more restiform structures. Similar observations were made in cells isolated from cerebral cavernous malformations in angiogenesis assays. The results of this thesis confirm, that the loss of function of *CCM1* in endothelial cells plays a major role in changes leading to the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. The accomplished proliferation assay showed a reduction of proliferation, which demonstrates that the loss of function of *CCM1* has a direct effect on cell proliferation.

7. Literaturverzeichnis

Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell*. 6:109-16, 2000

Balaban H, Sener HO, Erden I, Çağlar S, Sahin A, Yüçemen N. Multiple spinal intramedullary cavernous angioma: case report. *Clin Neurol Neurosurg*. 103:120-2, 2001

Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E. Société Française de Neurochirurgie. Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet*. 76:42-51, 2005

Bertalanffy H, Benes L, Miyazawa T, Alberti O, Siegel AM, Sure U. Cerebral cavernomas in the adult. Review of the literature and analysis of 72 surgically treated patients. *Neurosurg Rev*. 25:1-53; discussion 54-5, 2002

Bertalanffy H, Gilsbach JM, Eggert HR, Seeger W. Microsurgery of deep-seated cavernous angiomas: report of 26 cases. *Acta Neurochir (Wien)*. 108:91-99, 1991

Bouvard D, Millon-Fremillon A, Dupe-Manet S, Block MR, Albiges-Rizo C. Unraveling ICAP-1 function: toward a new direction? *Eur J Cell Biol*. 85:275-82, 2006

Bricolo A Comment on: Functional results after microsurgical resection of brainstem cavernous malformations: retrospective study of a 12 patient series and review of the recent literature. *Acta Neurochir (Wien)*. 137:34-37, 2000

Busch CR, Heath DD, Hubberstey A. Sensitive genetic biomarkers for determining apoptosis in the brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Gene*. 329:1-10, 2004

Cavé-Riant F, Denier C, Labauge P, Cécillon M, Maciazek J, Joutel A, Laberge-Le Couteulx S, Tournier-Lasserre E. Spectrum and expression analysis of KRIT1 mutations in 121 consecutive and unrelated patients with Cerebral Cavernous Malformations. *Eur J Hum Genet.* 10:733-40, 2002

Chen J.x., Fan j.P., Yin G.K., Sun A.H., Liao J.C., Tan G.R., Huan G.Y. Li Y., Xie Y., Mao Y.M. Study of differentially expressed genes in laryngeal squamous cell carcinoma by cDNA Microarray. *Chin Acad J Sec Mil Med Univ.* 22: 519-522, 2001 [Chinese]

Clatterbuck RE, Eberhart CG, Crain BJ, Rigamonti D. Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 71:188-92, 2001

Couteulx SL, Brézin AP, Fontaine B, Tournier-Lasserre E, Labauge P. A novel KRIT1/CCM1 truncating mutation in a patient with cerebral and retinal cavernous angiomas. *Arch Ophthalmol.* 120:217-8, 2002

Craig HD, Gunel M, Cepeda O, Johnson EW, Ptacek L, Steinberg GK, Ogilvy CS, Berg MJ, Crawford SC, Scott RM, Steichen-Gersdorf E, Sabroe R, Kennedy CT, Mettler G, Beis MJ, Fryer A, Awad IA, Lifton RP. Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Genet.* 7:1851-8, 1998

Degani S, Balzac F, Brancaccio M, Guazzone S, Retta SF, Silengo L, Eva A, Tarone G. The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol.* 156:377-87, 2002

Denier C, Gasc JM, Chapon F, Domenga V, Lescoat C, Joutel A, Tournier-Lasserre E. Krit1/cerebral cavernous malformation 1 mRNA is preferentially expressed in neurons and epithelial cells in embryo and adult. *Mech Dev.* 117:363-7, 2002

Denier C, Goutagny S, Labauge P, Krivosic V, Arnoult M, Cousin A, Benabid AL, Comoy J, Frerebeau P, Gilbert B, Houtteville JP, Jan M, Lapierre F, Loiseau H, Menei P, Mercier P,

Moreau JJ, Nivelon-Chevallier A, Parker F, Redondo AM, Scarabin JM, Tremoulet M, Zerah M, Maciazek J, Tournier-Lasserre E. Société Française de Neurochirurgie. Mutations within the MGC4607 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet.* 74:326-37, 2004a

Denier C, Labauge P, Bergametti F, Marchelli F, Riant F, Arnoult M, Maciazek J, Vicaud E, Brunereau L, Tournier-Lasserre E. Société Française de Neurochirurgie. Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Ann Neurol.* 60:550-6, 2006

Denier C, Labauge P, Brunereau L, Cavé-Riant F, Marchelli F, Arnoult M, Cecillon M, Maciazek J, Joutel A, Tournier-Lasserre E. Société Française de Neurochirurgie; Société de Neurochirurgie de Langue Française. Clinical features of cerebral cavernous malformations patients with KRIT1 mutations. *Ann Neurol.* 55:213-20, 2004b

Dermietzel R. http://www.ruhr-uni-bochum.de/rubin/rbin1_01/medizin/Beitrag4/seite2.html

Dobyns WB, Michels VV, Groover RV, Mokri B, Trautmann JC, Forbes GS, Laws ER Jr. Familial cavernous malformations of the central nervous system and retina. *Ann Neurol.* 21:578-83, 1987

Dubovsky J, Zabramski JM, Kurth J, Spetzler RF, Rich SS, Orr HT, Weber JL. A gene responsible for cavernous malformation of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet.* 4:453-458, 1995

Eerola I, Plate KH, Spiegel R, Boon LM, Mulliken JB, Viskula M. KRIT1 is mutated in hyperkeratotic cutaneous capillary-venous malformation associated with cerebral capillary malformation. *Hum Mol Genet.* 9:1351-1355, 2000

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806-11, 1998

Fournier HN, Dupé-Manet S, Bouvard D, Luton F, Degani S, Block MR, Retta SF, Albiges-Rizo C. Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein1 stimulates cellular proliferation. *Mol Biol Cell.* 16:1859-71, 2005

Gass JD. Cavernous hemangioma of the retina. A neuro-oculo-cutaneous syndrome. *Am J Ophthalmol.* 71:799-814, 1971

Gunel M, Awad IA, Finberg K, Anson JA, Steinberg GK, Batjer HH, Kopitnik TA, Morrison L, Giannotta SL, Nelson-Williams C, Lifton RP. A founder mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Engl J Med.* 334:946-51, 1996

Gunel M, Laurans MS, Shin D, DiLuna ML, Voorhees J, Choate K, Nelson-Williams C, Lifton RP. KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:10677-10682, 2002

Guzeloglu-Kayisli O, Amankulor NM, Voorhees J, Luleci G, Lifton RP, Gunel M. KRIT1/cerebral cavernous malformation 1 protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. *Neurosurgery.* 54:943-9; discussion 949, 2004a

Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Amankulor NM, Voorhees JR, Gokce O, DiLuna ML, Laurans MS, Luleci G, Gunel M. Krev1 interaction trapped-1/cerebral cavernous malformation-1 protein expression during early angiogenesis. *J Neurosurg.* 100:481-7, 2004b

Hu HP, Zhang JP, Yin GK, Xiao ZY, Wu HM, Mao YM, Wu MC. Gene microarrays in detecting molecular mechanisms of cantharidin-mediated cytotoxicity on human hepatic cancer cells. *Chin. Acad. J. Sec. Mil. Med. Univ.* 24:645-649, 2003 [Chinese]

Huerta S, Harris DM, Jazirehi A, Bonavida B, Elashoff D, Livingston EH, Heber D. Gene expression profile of metastatic colon cancer cells resistant to cisplatin-induced apoptosis. *Int J Oncol.* 22:663-70, 2003

Jackson AL, Linsley PS. Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs. *Trends Genet.* 20:521-4, 2004

Jallo GI, Freed D, Zareck M, Epstein F, Kothbauer KF. Clinical presentation and optimal management for intramedullary cavernous malformations. *Neurosurg Focus.* 21:e10, 2006

Jiang XL, Yang JS, Zhang TF, Chen SS. Study on the difference of genotype and gene expression profile of human hepatocellular carcinoma cell HepG1 transduced with interferon- α . *Gene Chin J Gastroenterol*. 6:211-214, 2001 [Chinese]

Kehrer-Sawatzki H, Wilda M, Braun VM, Richter HP, Hameister H. Mutation and expression analysis of the KRIT1 gene associated with cerebral cavernous malformations (CCM1). *Acta Neuropathol (Berl)*. 104:231-40, 2002

Knudson AG Jr, Meadows AT, Nichols WW, Hill R. Chromosomal deletion and retinoblastoma. *N Engl J Med*. 295:1120-3, 1976

Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 1:157-62, 2001

Labauge P, Brunereau L, Laberge S, Houtteville JP. Prospective follow-up of 33 asymptomatic patients with familial cerebral cavernous malformations. *Neurology*. 57:1825-8, 2001

Labauge P, Brunereau L, Lévy C, Laberge S, Houtteville JP. The natural history of familial cerebral cavernomas: a retrospective MRI study of 40 patients. *Neuroradiology*. 42:327-32, 2000

Labauge P, Denier C, Bergametti F, Tournier-Lasserre E. Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol*. 6:237-44, 2007

Labauge P, Enjolras O, Bonerandi JJ, Laberge S, Dandurand M, Joujoux JM, Tournier-Lasserre E. An association between autosomal dominant cerebral cavernomas and a distinctive hyperkeratotic cutaneous vascular malformation in 4 families. *Ann Neurol*. 45:250-4, 1999

Labauge P, Laberge S, Brunereau L, Levy C, Tournier-Lasserre E. Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. *Société Française de Neurochirurgie. Lancet*. 352:1892-7, 1998

Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E. Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet*. 23:189-93. 1999

Laurans MS, DiLuna ML, Shin D, Niazi F, Voorhees JR, Nelson-Williams C, Johnson EW, Siegel AM, Steinberg GK, Berg MJ, Scott RM, Tedeschi G, Enevoldson TP, Anson J, Rouleau GA, Ogilvy C, Awad IA, Lifton RP, Gunel M. Mutational analysis of 206 families with cavernous malformations. *J Neurosurg.* 99:38-43, 2003

Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, Verlaan D, Balogun F, Hughes L, Leedom TP, Plummer NW, Cannella M, Maglione V, Squitieri F, Johnson EW, Rouleau GA, Ptacek L, Marchuk DA. Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet.* 73:1459-64, 2003

Ma X, Zhao H, Shan J, Long F, Chen Y, Chen Y, Zhang Y, Han X, Ma D. PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway. *Mol Biol Cell.* 18(6):1965-78, 2007

Maraire JN, Awad IA. Intracranial cavernous malformations: lesion behavior and management strategies. *Neurosurgery.* 37:591-605, 1995

Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS. Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet.* 12:97-112, 2003

McGeachie J. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/MoreAbout/Endothel.htm>

Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet.* 5:355-65, 2004

Moriarty JL, Wetzel M, Clatterbuck RE, Javedan S, Sheppard JM, Hoenig-Rigamonti K, Crone NE, Breiter SN, Lee RR, Rigamonti D. The natural history of cavernous malformations: a prospective study of 68 patients. *Neurosurgery.* 44:1166-71; discussion 1172-3, 1999

Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, Shen MM. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:10454-9, 2000

- Ogilvy CS, Louis DN, Ojemann RG. Intramedullary cavernous angiomas of the spinal cord: clinical presentation, pathological features, and surgical management. *Neurosurgery*. 31:219-29; discussion 229-30, 1992
- Otten P, Pizzolato GP, Rilliet B, Berney J. 131 cases of cavernous angioma (cavernomas) of the CNS, discovered by retrospective analysis of 24,535 autopsies. *Neurochirurgie*. 35:82-3; 128-31, 1989 [French]
- Petit N, Blécon A, Denier C, Tournier-Lasserre E. Patterns of expression of the three cerebral cavernous malformation (CCM) genes during embryonic and postnatal brain development. *Gene Expr Patterns*. 6:495-503, 2006
- Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum Sonderausgabe PCR*. 92-95, 2004
- Plummer NW, Gallione CJ, Srinivasan S, Zawistowski JS, Louis DN, Marchuk DA. Loss of p53 sensitizes mice with a mutation in *Ccm1* (*KRIT1*) to development of cerebral vascular malformations. *Am J Pathol*. 165:1509-18, 2004
- Plummer NW, Squire TL, Srinivasan S, Huang E, Zawistowski JS, Matsunami H, Hale LP, Marchuk DA. Neuronal expression of the *Ccm2* gene in a new mouse model of cerebral cavernous malformations. *Mamm Genome*. 17:119-28, 2006
- Plummer NW, Zawistowski JS, Marchuk DA. Genetics of cerebral cavernous malformations. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 5:391-6, 2005
- Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer D Nakagawara K., eds. *Rapid Cycle Real time PCR. Methods and Applications*. Springer Press Heidelberg. 21–34, 2001
- Revencu N, Vikkula M. Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J Med Genet*. 43:716-21, 2006

Rigamonti D, Hadley MN, Drayer BP, Johnson PC, Hoenig-Rigamonti K, Knight JT, Spetzler RF. Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence. *N Engl J Med.* 319:343-7, 1988

Robinson JR, Awad IA, Little JR. Natural history of the cavernous angioma. *J Neurosurg.* 75:709-14, 1991

Seker A, Pricola KL, Guclu B, Ozturk AK, Luovi A, Gunel M. CCM2 expression parallels that of CCM1. *Stroke.* 37:518-23, 2006

Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golemis EA. Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene.* 15:1043-9, 1997

Shao C, Deng L, Henegariu O, Liang L, Stambrook PJ, Tischfield JA. Chromosome instability contributes to loss of heterozygosity in mice lacking p53. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:7405-10, 2000

Siegel AM. Familial cavernous angioma: an unknown, known disease. *Acta Neurol Scand.* 98:369-71, 1998

Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics* 3rd ed.. Garland Science, New York. 152; 592-593, 2004

Sure U, Butz N, Schlegel J, Siegel AM, Wakat JP, Mennel HD, Bien S, Bertalanffy H. Endothelial proliferation, neoangiogenesis, and potential de novo generation of cerebrovascular malformations. *J Neurosurg.* 94:972-7, 2001

Sure U, Freman S, Bozinov O, Benes L, Siegel AM, Bertalanffy H. Biological activity of adult cavernous malformations: a study of 56 patients. *J Neurosurg.* 102:342-7, 2005

Tirakotai W, Fremann S, Soerensen N, Roggendorf W, Siegel AM, Mennel HD, Zhu Y, Bertalanffy H, Sure U. Biological activity of paediatric cerebral cavernomas: an immunohistochemical study of 28 patients. *Childs Nerv Syst.* 22:685-91, 2006

- Tu J, Stoodley MA, Morgan MK, Storer KP. Ultrastructural characteristics of hemorrhagic, nonhemorrhagic, and recurrent cavernous malformations. *J Neurosurg.* 103:903-9, 2005
- Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol.* 5:1104-10, 2003
- Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ. Microvasc Res. In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *64:384-97, 2002*
- Verlaan DJ, Laurent SB, Rochefort DL, Liquori CL, Marchuk DA, Siegel AM, Rouleau GA. CCM2 mutations account for 13% of cases in a large collection of kindreds with hereditary cavernous malformations. *Ann Neurol.* 55:757-8, 2004
- Verlaan DJ, Siegel AM, Rouleau GA. Krit1 missense mutations lead to splicing errors in cerebral cavernous malformation. *Am J Hum Genet.* 70:1564-7, 2002
- Wang YG, Liu HT, Zhang YM, Ma DL. cDNA cloning and expression of an apoptosis-related gene, human TFAR 15 gene. *Science in China series C-life sciences.* 29:331-336, 1999 [Chinese]
- Whitehead KJ, Plummer NW, Adams JA, Marchuk DA, Li DY. Ccm1 is required for arterial morphogenesis: implications for the etiology of human cavernous malformations. *Development.* 131:1437-1448, 2004
- Wong JH, Awad IA, Kim JH. Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: a preliminary report. *Neurosurgery.* 46:1454-9, 2000
- Yang J, Boerm M, McCarty M, Bucana C, Fidler IJ, Zhuang Y, Su B. Mek3 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Nat Genet.* 24:309-13, 2000 [Chinese]
- Zabramski JM, Henn JS, Coons S. Pathology of cerebral vascular malformations. *Neurosurg Clin N Am.* 10:395-410. 1999

Zabramski JM, Wascher TM, Spetzler RF, Johnson B, Golfinos J, Drayer BP, Brown B, Rigamonti D, Brown G. The natural history of familial cavernous malformations: results of an ongoing study. *J Neurosurg.* 80:422-32, 1994

Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golemis EA, Marchuk DA. KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 11:389-96, 2002

Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlik MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, Marchuk DA. CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 14:2521-31, 2005

Zevgaridis D, Medele RJ, Hamburger C, Steiger HJ, Reulen HJ. Cavernous haemangiomas of the spinal cord. A review of 117 cases. *Acta Neurochir (Wien).* 141:237-45, 1999

Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC. Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet.* 10:2953-60, 2001

Zhao Y, Tan YZ, Zhou LF, Wang HJ, Mao Y. Morphological observation and in vitro angiogenesis assay of endothelial cells isolated from human cerebral cavernous malformations. *Stroke.* 38:1313-9, 2007

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

Sofern hier nicht aufgeführt, wurden Abkürzungen entsprechend den Maßangaben der IUPAC (International union of pure and applied chemistry) und denen des SI-Systems (System Internationale de l'Unité) verwendet.

CCM	Cerebral Cavernous Malformation
CCM1	Cerebral Cavernous Malformation 1
CCM2	Cerebral Cavernous Malformation 2
CCM3	Cerebral Cavernous Malformation 3
cDNA	Complementary Desoxyribonukleinsäure
c-Myc	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
Ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus
Dll4	Delta like 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Efnb2	Ephrin B2
ERK	Ephrin receptor EphB2
FCS	Fetal calf serum
FERM	4.1-Protein (Four-point-one), Ezrin, Radixin, Moesin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)- Ethansulfonsäure
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAP1 α	Integrin cytoplasmic domain-associated protein 1A
Ki-67	Proliferation-related Ki-67 antigen

k.d.	knock down
KREV1	RAS-related protein 1A
KRIT1	KREV interaction trapped 1
MEKK3	Mitogen-activated kinase kinase kinase 3
MGC4607	CCM2
MIB-1	Antikörper gegen Ki-67
MKK3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3
M-MuLV	Moloney-murine leukemia virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MST4	MST3- and SOK1-related kinase
NLS	Nuclear localization sequence
Notch4	Notch homolog 4 (Drosophila)
NPxY	Aminosäuresequenz Asp-Pro-x-Tyr
p38MAPK	Mitogen-activated protein kinase 14
p53	Tumor protein p53
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCD10	Programmed cell death 10
PTB	Phosphotyrosin binding domaine
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAC1	RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAP1A	RAS-related protein 1a, KREV1
RAS	Rat sarcoma viral oncogene-Homologe
RISC	Ribonukleinsäure induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
siRNA	Short interfering Ribonukleinsäure

SYBR	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)- propylamino]-1-phenyl- 1H-chinolin-4-ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TF-1	Humane promyeloide Zelllinie
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UV	Ultraviolett

8.2. Lebenslauf

8.2.1. Persönliche Daten

Name: Bodil Hansen
Adresse: Folkbertusstr. 11, 61440 Oberursel
Telefon: 0176-23158654
E-mail: hansenbodil@hotmail.com
Geburtstag: 02.07.1981 in Schleswig
Familienstand: ledig

8.2.2. Schulbildung

1988-1992 Grund- und Hauptschule, Husby
1998-1999 High School, Rushford-Peterson, Minnesota, USA
1999 US American High School Graduation, Rushford-Peterson, Minnesota, USA
1992-2001 Gymnasium, Kurt Tucholsky Schule, Flensburg-Adelby
2001 Abitur, Kurt Tucholsky Schule, Flensburg-Adelby

8.2.3. Hochschulbildung

Oktober 2001 Beginn Studium der Humanmedizin, Philipps Universität Marburg
August 2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Philipps Universität Marburg
Juni 2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Philipps Universität Marburg

8.2.4. Promotion

seit November 2006 Promotion in der Neurochirurgie der Philipps
Universität Marburg unter der Leitung von
Prof. Dr. med. U. Sure mit dem Thema:
„Quantitativer Nachweis von *CCM1*, *CCM2*
und *CCM3* sowie die Analyse
morphologischer und proliferativer
Veränderungen nach Runterregulation von *CCM1* in
HUV Endothelzellen“

8.2.5. Beruflicher Werdegang

seit August 2009 Assistenzärztin in der Facharztausbildung
Klinik für Gynäkologie, gynäkologische Endokrinologie
und Onkologie
Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort
Marburg, Prof. Dr. med. U. Wagner

8.3. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Alfke, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Bertalanffy, Boudriot, Brehm, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Gerdes, Gotzen, Gress, Grzeschik, Gudermann, Grundmann, Herrmann-Lingen, Hasilik, Hassan, Hertl, Hofmann, Jungclas, Kann, Kill, Klenk, Klose, Koch, Koolmann, Krieg, Krill, Kunz, Lang, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maier, Mandrek, Max, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Radsak, Remschmidt, Renz, Richter, Rieder, Röhm, Röper, Rothmund, Schäfer, Schrader, Seitz, Seybert, Schmidt, Steiniger, Sure, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Westphal, Wulf, Zemlin

in Marburg.

8.4. Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. U. Sure und Frau Dr. Y. Zhu, die mir die Bearbeitung eines sehr interessanten Themas ermöglichten und die mit ihrer Betreuung und Unterstützung maßgeblich zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen, besonders Frau Sabine Motzny und Herrn Moritz Fass, die mich bei der Arbeit im Labor unterstützt und die eine sehr freundliche und fröhliche Atmosphäre im Labor geschaffen haben.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Martin Eilers, bei dem ich die ersten Erfahrungen im Labor sammeln durfte und in dessen Labor ich lernen konnte, selbstständig zu arbeiten. Erst diese Zeit ermöglichte mir die Durchführung dieser hier niedergeschriebenen Arbeit. Besonderer Dank für das Beantworten vieler Fragen gilt Herrn Dr. med. Axel Weber und Herrn Dr. Till Kortüm.

Danke Euch allen für die schöne Zeit!

Einen großen Dank auch an alle weiteren Freunde und an meine Familie, die stets für mich da war. Danke für die fortwährende Unterstützung.

8.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Qualitativer Nachweis von *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* sowie die Analyse morphologischer und proliferativer Veränderungen nach Verminderung der Expression von *CCM1* in HUV Endothelzellen“

in der Klinik für Neurochirurgie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. med. U. Sure ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Diese Arbeit wurde zum Teil als Poster veröffentlicht:

Zhu Y., Wu Q., Fass M., Hansen B. Bertalanffy H., Sure U., Expression and functional study of CCM genes in endothelial cells of cerebral cavernous malformations (CCMs), Meeting DGNC Würzburg (Deutschland) 2008

Marburg, den 10.12.2008